

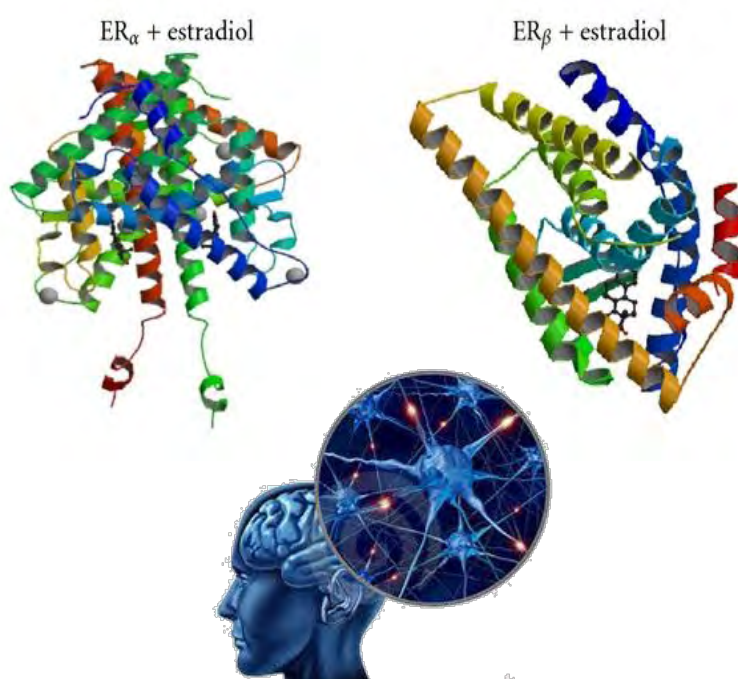


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΚΟΜΝΗΝΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΔΡ. ANNA-MARIA Γ. ΨΑΡΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

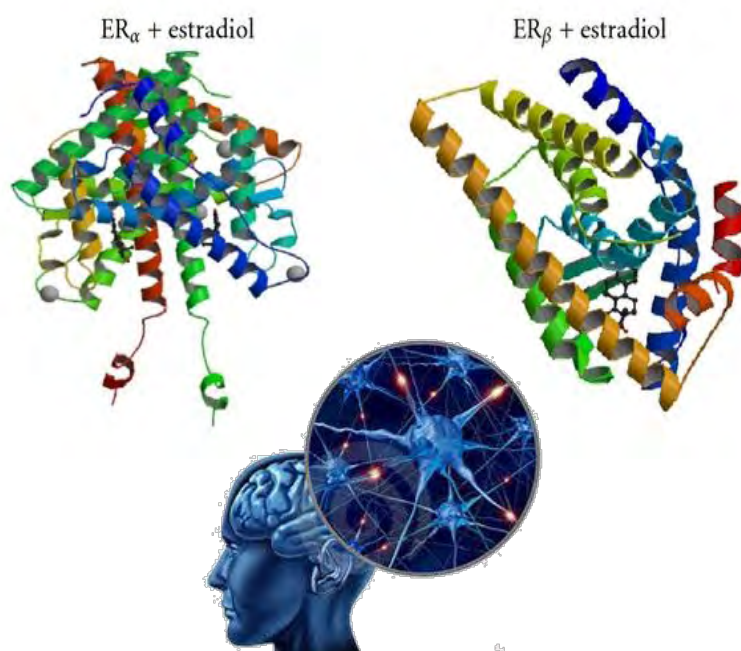


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



DEP. OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

«EVALUATION OF PUTATIVE OESTROGENIC ACTIVITY OF ALUMINUM IN NEURONAL CELLS»



DIPLOMA PROJECT OF THE STUDENT: KOMNINOU ANGELIKI

SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA

LARISSA, 2014

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

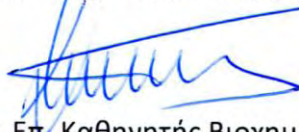
Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.



Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.



Μπαλατσός Νικόλαος, Επ. Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ	10
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	12
1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ.....	13
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ - ESTROGEN RECEPTORS.....	14
1.3.1 ESTROGEN RECEPTORS-ERA ΚΑΙ ERB ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΑΥΤΩΝ.....	14
1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS	16
Α) ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (GENOMIC ACTION) :	16
1.ΚΛΑΣΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS, ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ	16
2. ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ERE ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	17
3.ΜΗ ΠΡΟΣΔΕΤΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ER, ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	17
Β) ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (NON- GENOMIC ACTION):.....	17
Γ) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ	19
1.3.3 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ: ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	19
.....	19
1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ B- ERB.....	20
1.3.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ) ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	22
1.3.6 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ B (ERB) ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	23
1.4 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	25
1.4.1 ΑΛΛΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	26
1.4.2 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ- ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ	27
1.4.3 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	28
1.4.4 ALUMINUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ ΥΔΡΟΪ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΑΡΓΙΛΙΟ (ALUMINUM CHLORHYDRATE, ACH).....	29
1.4.5 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ACH.....	30

1.5 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ.....	31
2.ΣΚΟΠΟΣ	32
3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	34
3.2 ΥΛΙΚΑ	34
3.2.1 ΧΗΜΙΚΑ	34
3.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	36
3.2.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	36
3.2.4 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ:.....	39
3.2.5 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	39
3.2.6 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	39
3.2.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	40
3.2.8 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	41
3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ	42
3.3.0Α ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	42
3.3.0Β ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡDNA ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΕΣΑΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ (MIDI PREP)	42
3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	42
3.3.1.1 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	42
3.3.1.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	43
3.3.1.3 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	44
3.3.1.4 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	45
3.3.1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (TRANSFECTION).....	46
3.3.1.6 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	48
3.3.1.7 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS	50
3.3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	50
3.3.2.1Α ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ/Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ	50
3.3.2.1Β ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)	52
3.3.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	53
3.3.2.3 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΑΦΟΡΑ	55
3.3.2.4 BLOCKING ΜΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	56

3.3.2.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ -WESTERN BLOT.....	56
3.3.2.6 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (IHC).....	57
4.ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	59
5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ERS ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Ν2Α ΚΑΙ SH-SY5Y	59
5.1.1. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΑΛΦΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERA) ΣΕ Ν2Α ΚΑΙ SHSY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ.....	59
5.1.2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERB) ΣΕ ΚΑΙ Ν2Α SHSY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ.....	60
5.1.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ Ν2Α ΚΑΙ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	62
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ WT Ν2Α ΚΑΙ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΩΝ	62
5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΛΑΤΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	64
5.3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΗΣ E2 ΚΑΙ ACH ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Ν2Α WT.	64
5.3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΩΝ	64
5.3.3 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΚΑΙ E2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ.....	65
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

Ευχαριστίες

Φθάνοντας στο τέλος αυτής όλης της προσπάθειας και όντας γεμάτη από νέες γνώσεις και εμπειρίες, νιώθω μεγάλη ευγνωμοσύνη στο Θεό, αλλά και σε πάρα πολλούς ανθρώπους που με τον δικό τους τρόπο ο κάθε ένας συνέβαλε, στο να έλθει εις πέρας αυτή η εργασία αλλά και ολόκληρο αυτό το «ακαδημαϊκό ταξίδι».

Αρχικά λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επ. Καθηγήτρια, Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, η οποία μου έκανε την τιμή να είναι επιβλέπουσα μου και που στάθηκε και στέκεται δίπλα μου ως «πεφιλημένη διδάσκαλος». Ήταν όντως ιδιαίτερη χαρά αυτή η συνεργασία. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου, Αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, για το ότι δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή μου επιτροπή αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κάνοντάς με δεκτή στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης τον Επ. Καθηγητή Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό για την συμβολή του, τον καλό του λόγο και την υποστήριξή του.

Επιπλέον, θα ήθελα από βάθους καρδιάς να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, Γοργογιέτα Βύρωνα, για τη συνεχόμενη υποστήριξη και βοήθεια του, για την ανοχή του και όλη την άμετρη προσπάθειά του να διευκολύνει και να εξηγεί τα πάντα σε όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής δουλειάς. Ευχαριστώ ακόμη την πολύ καλή μου φίλη Χαραλάμπους Μαρία, για την «διδασχία των πρώτων εργαστηριακών βημάτων», την μετέπειτα βοήθεια, αλλά και για τη φιλία της. Πολύ σημαντική βοήθεια πρόσφεραν και όλοι οι υποψήφιοι διδάκτορες του εργαστηρίου: Καντσάδη Νατάσα, Κυρίτσης Θάνος, Μαραγγοζίτης Παναγιώτης, Στραβοδής Γεώργιος και Χατζιλεοντιάδου Δήμητρα, προσφέροντας μεγάλη στήριξη τόσο σε πρακτικά όσο και θεωρητικά θέματα, γι' αυτό και τους ευχαριστώ, έναν-έναν ξεχωριστά. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υποψήφιους διδάκτορες Γκουτζουρέλα Νίκο, Θέμη Γιαννούλη και Ελένη Γαλλιοπούλου για την όποια βοήθεια και τη σωστή και καθημερινή συνεννόηση. Ευχαριστώ και όλα τα παιδιά που δουλεύουν στο εργαστήριο για όλες τις βοήθειες, την παρέα και τη συνεργασία. Ιδιαίτερα δε, ευχαριστώ τη Βάσια, το Θύμιο, τη Ραφαέλα, τον Αλέκο, το Διονύση, τη Ντιάνα και την Παρούλα, για όλες τις στιγμές και την ομαλή συνεργασία, τη βοήθεια και τη φιλία.

Κλείνοντας, και γνωρίζοντας ότι παραλείπω πολλούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς όλους τους δικούς μου ανθρώπους που ήταν «εκεί» για όλα και με στήριξαν και με στηρίζουν, που υπομένουν και υπάρχουν... Έτσι, ευχαριστώ τους γονείς και τον αδερφό μου, τη Γερόντισσα και τις αδερφές μου και βέβαια όλους τους καλούς μου φίλους και φίλες για όλα όσα περάσαμε μαζί. Σίγουρα, υπάρχουν κάποια πράγματα που δεν μπορούν να εκφραστούν με λόγια, ένα από αυτά είναι και η βαθύτατη ευγνωμοσύνη που αισθάνομαι προς όλους, έτσι κλείνω με ένα απλό ευχαριστώ και ένα συγγνώμη για όσους παρέλειψα να αναφέρω, τους οποίους και ευχαριστώ πολύ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων άλφα και βήτα, (Estrogen Receptor alpha and beta, ERα και ERβ) είναι οι δύο κύριες ισομορφές των υποδοχέων των οιστρογόνων. Η δε βήτα μορφή του υποδοχέα φαίνεται να έχει ανταγωνιστική δράση έναντι της άλφα. Δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμίζουν την έκφραση πληθώρας γονιδίων, εξασφαλίζοντας τη σωστή και ομαλή λειτουργία του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Ως εκ τούτου, η δράση τους είναι καίρια και για την εύρυθμη λειτουργία του νευρικού συστήματος και του εγκεφάλου, ενώ η διαταραχή της, μπορεί να συμβάλει στη παθογένεση διάφορων διαταραχών μεταξύ των οποίων ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

Τα μεταλοοιστρογόνα είναι μέταλλα τα οποία έχουν την ικανότητα να μιμούνται τα οιστρογόνα και να πυροδοτούν ή να καταστέλλουν τα διακυτταρικά μονοπάτια της οιστρογονικής σηματοδότησης, ή να επεμβαίνουν στη μεταγραφή και έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από τα οιστρογόνα. Το υδρόξυ χλωριούχο αργίλιο (Aluminum Chlorhydrate, ACH) αποτελεί μία τέτοια ένωση, ερχόμενο μάλιστα σε καθημερινή και χρόνια επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά των αποσμητικών και άλλων προϊόντων κοσμετολογίας. Έχει δε, ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή του στα γεγονότα τη καρκινογένεσης ιστών όπως ο μαστός, άλλα και εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε εγκεφάλους ατόμων με νόσο Αλτςχάιμερ, γι' αυτό και βρίσκεται υπό συνεχή μελέτη.

Έτσι λοιπόν, σκοπός της εργασίας αυτής, είναι ο χαρακτηρισμός νευρικών κυττάρων (SH-SY5Y και N2A wt), ως προς την ύπαρξη και δράση των ισομορφών των υποδοχέων των οιστρογόνων και η πιθανή οιστρογονική δράση του ACH. Μέσω των πειραμάτων μας, πιστοποιείται η ύπαρξη της βήτα ισομορφής των ERs καθώς και η μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, μελετάται και εξακριβώνεται η πιθανή οιστρογονική δράση των ενώσεων του αργιλίου στα κύτταρα αυτά, με τη χρήση, ανοσολογικών (Western Blot) και ανοσοϊστοχημικών τεχνικών, με τη βοήθεια των οποίων παρατηρείται μετατόπιση του ERβ στα μιτοχόνδρια- και επομένως δράση παρόμοια με την οιστραδιόλη (17β- οιστραδιόλη), τον φυσικό προσδέτη των ERs. Κατόπιν, σε επόμενη φάση, παρουσία του ACH σημειώνεται μείωση των επιπέδων ενδογενών αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ενζύμων, όπως είναι η καταλάση και η μαγγανική δισμουτάση του σουπεροξειδίου, έκφραση των οποίων επάγεται από τον ERβ. Για το λόγο αυτό, απαιτείται μελλοντικά περαιτέρω έρευνα του οιστρογονικού σήματος του αργιλίου, προκειμένου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί συμμετοχής του στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Τέλος, για την όσο το δυνατόν ορθότερη προσέγγιση, επιχειρείται και βελτιστοποίηση των τεχνικών παροδικής διαμόλυνσης των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών.

ABSTRACT

Estrogen Receptors alpha and beta, are the two main isoforms of the estrogen receptor family. Experimental data shows that estrogen receptor beta acts in a competitive way to the alpha isoform. They act mostly, as transcription factors, by regulating the expression of an abundance of genes and so obtaining the right and smooth function of the cell and the whole organism. Therefore their action is vital for the normal function of the nervous system and the brain as well, while their disorganization can contribute to the pathogenesis of several disorders, including cancer and neurodegenerative diseases.

We name some metals as metalloestrogens, because they have the ability to mimic estrogens and so to trigger or suppress the intracellular signaling pathways, or to interfere in the transcription and expression of the estrogen receptor target genes. Aluminum Chlorhydrate(ACH), is an example of such a substance; it is being used on a regular basis and for many years, being in a contact with the human body, as it is a main ingredient of the deodorants and other cosmetic products. It has been criminalized for its contribution to the carcinogenesis events of tissues like the breast, and for its presence in high concentrations in the brains of patients who suffered from Alzheimer's disease. For all this reasons, ACH is under continuous testing.

So, considering all that we have mentioned above, the goal of this project is the characterization of nerve cells (cancer cell lines SH-SY5Y and N2Awt), for the presence and action of the specific isoforms of the estrogen receptors especially the putative estrogenic action of ACH. Our experiments have certified the presence of the beta isoform of the ERs and its localization to the mitochondria as well. Simultaneously, we have studied and verified the putative estrogenic action of the aluminum compounds, by using immunoblotting techniques (Western Blot) and immunohistochemistry. The use of these techniques, allow us to observe the translocation of the ER β to the mitochondria, in the presence of ACH, showing an E2-like action (E2: 17 β -estradiol, the natural ER ligand). In a next phase, we found that cells that had been cultured in the presence of ACH exhibited decrease in the antioxidant enzymes protein levels. Such enzymes are Catalase and MnSOD, whose genes are up-regulated by ER β . As a result, an additional future study for aluminum's estrogenic action is required, so that the mechanisms of its contribution to the pathogenesis of neurodegenerative diseases be clarified. Finally, the improvement of the transfection technique, for the used cell lines has been attempted for the best approach to all those questions.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ

A→ Amper

α.α ,(a.a)→ αμινοξέα

Ab→ Antibody

ACH→ Aluminum Chlorhydrate

AD→ Alzheimer disease

AF 1 → Activation Functions 1

AF 2→ Activation Functions 2

APP →Amyloid Precursor Protein

CRE→ cAMP Response Elements

DBD→DNA Binding Domain

DES→ Diethyl estrdiol

DMSO→Di-Methyl-Sulph-Oxide

E1→ οιστρόνη

E2→ 17β-οιστραδιόλη

E3→ εστριόλη

ERα→ Estrogen Receptor alpha

ERβ→ Estrogen Receptor beta

EGF→Epidermal Growth Factor

eNOS→ endothelial Nitric oxide synthase

EREs →Estrogen Response Elements

IGF-1→ Insulin-like Growth Factor-1

FBS→Fetal Bovine Serum

Gel→ πηκτή πολυακρυλαμίδης, στη συγκεκριμένη εργασία επειδή έγινε ανάλυση πρωτεϊνών τα gel που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πηκτές πολυακρυλαμίδης 10%,

GR→ Glucocorticoid Receptor

HREs→Hormone Response Elements

ICI→ICI 182.780, χημικό όνομα 7α,17β-(9-((4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων

IHC→ Immuno-Histo-Chemistry (Ανοσοϊστοχημεία)

ΚΝΣ→ Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

LBD → Ligand Binding Domain

L.G→ L- Glutamine

MS →Multiple Sclerosis, Σκλήρυνση κατά Πλάκας

NHRs→ Nuclear Hormone Receptors

ΝΣ→Νευρικό Σύστημα

ONPG→Ορθο-Νιτροφαινυλ-γαλακτοσίδη, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης.

PPARs→ Peroxisome Proliferator-activated Receptors

PD→ Parkinson disease

R.T→Room Temperature

SERMs →Selective Estrogen Receptors Modulators

WB→ Western Blot, Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών

wo. P.R→ without Phenol Red (απουσία χρωστικής ερυθρό της φαινόλης)

w.P.R→ with Phenol Red

κ/α→ κυτταροκαλλιέργεια

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

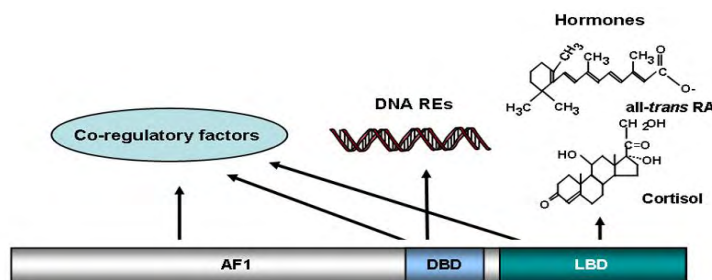
Οι πυρηνικού υποδοχείς, Nuclear Hormone Receptors (NHRs), αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη οικογένεια προσδετο-ενεργοποιούμενων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση πάρα πολλών διεργασιών, όπως αυτών της ανάπτυξης, της μεταβολικής ομοιόστασης, του ισοζυγίου του άλατος και κατ' επέκταση τη διατήρηση του ισοζυγίου του ύδατος και της οξεοβασικής ισορροπίας και φυσικά της ανάπτυξης, ωρίμανσης και ομαλής λειτουργίας το αναπαραγωγικού συστήματος. Οι προσδέτες των πυρηνικών υποδοχέων, είναι συνήθως μικρά υδρόφοβα μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, οι θυρεοειδείς ορμόνες και η βιταμίνη D (McEwan et al. 2009).

Στο σύνολό τους οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης, ως εκ τούτου φέρουν όλοι τα εξής ακόλουθα χαρακτηριστικά: διαθέτουν ένα μακρύ αμινο –τελικό άκρο, ένα καρβόξυ τελικό άκρο που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του υποδοχέα με τον προσδέτη του, ένα μέρος σύνδεσης με το DNA (DBD, DNA Binding Domain), το οποίο έχει χαρακτηριστική δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) (Gonzalez et al. 2014)

Υπάρχουν πολλοί τρόποι κατηγοριοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων, ο απλούστερος από αυτούς είναι η τοποθέτησή τους σε δύο ομάδες:

Οι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου I: περιλαμβάνει τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs), τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GRs), της προγεστερόνης, των αλατοκορτικοειδών (mineralcorticoids) και των ανδρογόνων. Σε αυτού του τύπου τους υποδοχείς, η ορμόνη προσδένεται στο LBD (Ligand Binding Domain) του καρβόξυ- τελικού άκρου του υποδοχέα, ο υποδοχέας ενεργοποιείται από την πρόσδεσή του με τον προσδέτη του, δημιουργεί ομοδιμερή (με άλλους όμοιους ενεργοποιημένους υποδοχείς) και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που φέρουν ανάστροφες επαναλήψεις, προκειμένου να συμμετάσχει στη μεταγραφή των γονιδίων που συνδέθηκε (Gonzalez et al. 2014).

Στους πυρηνικούς υποδοχείς τύπου II: ο υποδοχέας διατηρείται στον πυρήνα και συνδέεται με το γενετικό υλικό ως ετεροδιμερές. Το ετεροδιμερές αυτό, σχηματίζεται με τη σύνδεση των υποδοχέων αυτής της κατηγορίας με έναν διαφορετικό πυρηνικό υποδοχέα, τον ρετινοειδή υποδοχέα X. Η πρόσδεση του ετεροδιμερούς αυτού γίνεται σε ευθείς επαναλήψεις του DNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μεταξύ άλλων και οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors), Liver X receptors και οι υποδοχείς της βιταμίνης D (VDRs) (Gonzalez et al. 2014)



Εικόνα 1

Δομικές και λειτουργικές υπομονάδες των πυρηνικών υποδοχέων: Παρουσιάζεται η βασική οργάνωση των υπομονάδων των NHR: LBD, ligand binding domain; DBD, DNA binding domain και AF1 και AF2, activation functions 1 και 2 στο NTD (N-Terminal Domain) and LBD, στο πάνω μέρος του σχήματος παρουσιάζονται σχηματικά, παραδείγματα αλλοστερικών τροποποιητών των NHR. Σε αυτούς περιλαμβάνονται μόρια όπως είναι η βιταμίνη α και η κορτιζόλη, οι οποίες και προσδένονται στο LBD. Οι NHR αλληλεπιδρούν με DNA Response Elements (RE), τα οποία μπορούν επίσης να υποστούν αλλοστερική ρύθμιση, που μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές της δομής ή της λειτουργίας του υποδοχέα. Στις περιοχές: AF1 στο NTD, και AF2 στο LBD έχουν εντοπιστεί να προσδένονται συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες ενδεχομένως να έχουν αλλοστερικά αποτελέσματα στη διαμόρφωση του υποδοχέα. (McEwan et al. 2009), www.nursa.org

1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Κυτταρικά, μπορούν να εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή ακόμη και στη μεμβράνη. Στην απενεργοποιημένη τους μορφή βρίσκονται συνδεδεμένοι με Hsps (Heat shock proteins)- πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η σύνδεση του προσδέτη (δηλαδή του αντίστοιχου για τον υποδοχέα στεροειδούς), οδηγεί στην ενεργοποίησή του. Αυτό συνεπάγεται την αποσύνδεση του υποδοχέα από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ, τον διμερισμό του υποδοχέα με έναν όμοιό του, προς σχηματισμό ενός ομοδιμερούς και τέλος, τη μετατόπιση του ομοδιμερούς αυτού στον πυρήνα. Εκεί, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας, έχει ως στόχο τη σύνδεσή του με το DNA σε κατάλληλα σημεία αλληλεπίδρασης με αυτό. Τα στοιχεία αυτά είναι τα HREs (Hormone Response Elements) και βρίσκονται συνήθως στους υποδοχείς των γονιδίων στόχων (Gupta et al. 2013).

Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες. Επειδή, στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τους υποδοχείς των οιστρογόνων, θα αναφερθούμε μόνο στην πρώτη εκ των τεσσάρων, κατηγορία, στην οποία και ανήκουν οι ERs.

Οι στεροειδείς, λοιπόν, υποδοχείς τύπου I, συνήθως προσδένονται στα HREs, τα οποία ιδανικά αποτελούν αναστροφές επαναλήψεως. Εκτός των ERs, η συγκεκριμένη υποκατηγορία στεροειδών υποδοχέων περιλαμβάνει και τους υποδοχείς της προγεστερόνης, των γλυκο- και άλατο- κορτικοειδών, καθώς και τους υποδοχείς των ανδρογόνων (Gupta et al. 2013).

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των στεροειδών υποδοχέων, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς, είναι ότι διαθέτουν την ικανότητα πρόκλησης και μη γενωμικής

δράσης (εκτός από της κλασικής γενωμικής τους δράσης). Η μη γενωμική αυτή δράση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και καταρρακτών αντιδράσεων, που οδηγούν σε άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις. Οι μεμβρανικοί στεροειδείς υποδοχείς, συμπεριλαμβάνουν και κάποιους υπότυπους των ER και καθώς και υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με G- πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικά, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, υφίστανται προσδετο-επαγόμενη καταστολή. Αυτή, αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό- από άποψη φυσιολογίας ανατροφοδοτικό μηχανισμό, που περιορίζει την ορμονική δράση στους ιστούς στόχους (Gupta et al. 2013).

Ειδικοί προσδέτες για τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, είναι οι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Διαχωρίζονται: α) σε στεροειδή του φύλου, που περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη με τα παράγωγά της, β) σε γλυκοκορτικοειδή και άλατοκορτικοειδή, που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων και γ) σε όμοιες με τα στεροειδή ενώσεις, όπως είναι η βιταμίνη D και τα παράγωγά της, το ρετινοϊκό οξύ και τα PPARs. Η ανακύκλωση και ο καταβολισμός των στεροειδών ορμονών συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους περιφερικούς ιστούς ή στους ιστούς δράσης της κάθε ορμόνης. Τέλος, στο αίμα, οι στεροειδείς ορμόνες μεταφέρονται με ειδικές πρωτεΐνες φορείς, όπως η γλοβουλίνη πρόσδεσης των φυλετικών ορμονών και η γλοβουλίνη πρόσδεσης των κορτικοειδών (Gupta et al. 2013).

1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ - ESTROGEN RECEPTORS

Έχοντας ήδη κάνει μία μικρή αναφορά στους πυρηνικούς και κατόπιν στους στεροειδείς υποδοχείς, προχωρούμε προς το μείζον θέμα της παρούσης εργασίας, που είναι οι υποδοχείς των οιστρογόνων.

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων, (Estrogen Receptors, ERα και ERβ), όπως προαναφέρθηκε, είναι πυρηνικοί υποδοχείς που έχουν δράση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες στον ανθρώπινο οργανισμό και για το λόγο αυτό σχετίζονται ή εμπλέκονται στην παθογένεση μίας μεγάλης ποικιλίας παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, μεταβολικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, φλεγμονή και οστεοπόρωση (Paterni et al. 2014). Είναι εκείνοι οι υποδοχείς, οι οποίοι διαμεσολαβούν, προκειμένου να μεταβιβαστεί το μήνυμα που φέρουν τα οιστρογόνα, κατά την οιστρογονική σηματοδότηση.

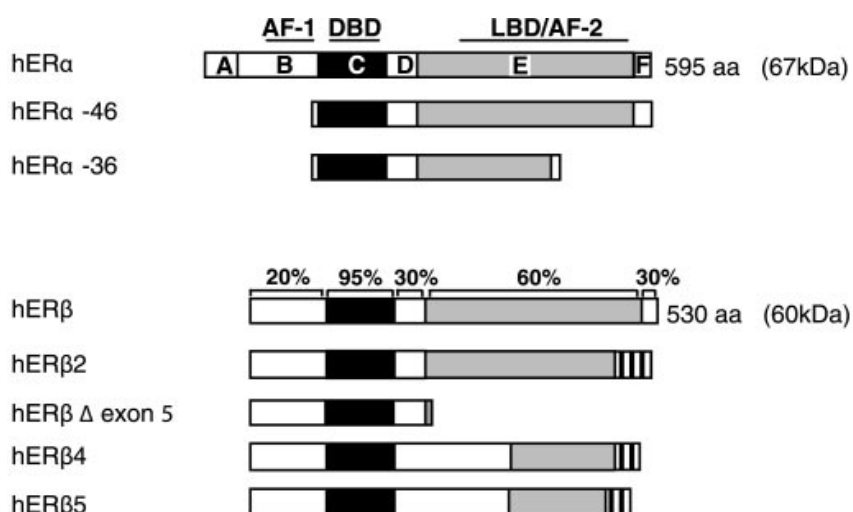
1.3.1 ESTROGEN RECEPTORS-ERA ΚΑΙ ERB ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΑΥΤΩΝ

Για τους υποδοχείς των οιστρογόνων, έχουν εντοπισθεί δύο κύριοι υπότυποι. Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και ο υποδοχέας των οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2). Και οι δύο τύποι των υποδοχέων, έχουν ορισμένες εξελικτικά συντηρημένες, δομικές και λειτουργικές περιοχές. Η κεντρική και περισσότερο συντηρημένη περιοχή είναι το DBD, το οποίο και είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA. Μία εξίσου σημαντική περιοχή είναι η περιοχή LBD, η οποία και εντοπίζεται στο καρβόξυ- τελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του προσδέτη στον υποδοχέα. Το αμινο-τελικό άκρο, δεν είναι

συντηρημένο και αποτελεί το πιο πολυποίκιλο τμήμα, από άποψη τόσο μήκους όσο και αμινοξικής αλληλουχίας.(Heldring et al. 2007)

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα διευκολύνεται από δύο διακριτές περιοχές ενεργοποίησης, την AF-1 (Activation Functions 1), η οποία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και είναι ιδιόσυστατα ενεργή και την AF-2, που εντοπίζεται στο LBD του C-τελικού άκρου του υποδοχέα και είναι προσδετοεξαρτώμενη. Η περιοχή AF2, περιλαμβάνει μία υψηλά συντηρημένη αμφιπαθή έλικα (H12) η οποία είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από τον προσδέτη, μεταγραφική ενεργότητα ολόκληρου του υποδοχέα, αλλά και την αλληλεπίδρασή του με άλλους συνενεργοποιητές που ανήκουν στην οικογένεια SRC (Hall et al. 2001). Και οι δύο AF περιοχές στρατολογούν στον υποδοχέα ένα σύνολο συρυθμιστικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (Heldring et al. 2007).

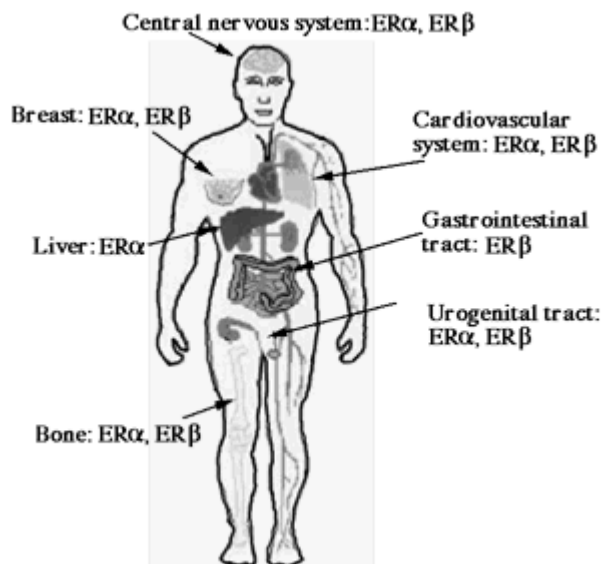
Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μοιράζονται υψηλό βαθμό αλληλουχικής ομολογίας- εκτός από το N-τελικό τους άκρο. Επίσης, και οι δύο υποδοχείς έχουν παρόμοια συγγένεια με την E2 και δεσμεύονται στα ίδια στοιχεία του γενετικού υλικού.



Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση των περιγραφόμενων ισομορφών των ER στον άνθρωπο, καθώς και κάποια μεταλλάγματα. Οι περιοχές των υποδοχέων περιλαμβάνουν τα: DBD, LBD και τις δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-1 και AF-2. Το πλήρες μήκος του hER είναι 595 α.α. Και οι δύο ελλειπείς ισομορφές του hER παρουσιάζουν έλλειψη στο N-τελικό τους άκρο (AF-1). Τα σημεία με τις ρίγες, αντιπροσωπεύουν διαφορές στο C-τελικό των τριών ισομορφών. Οι ισομορφές που εμφανίζονται ολόκληρες στην εικόνα, είναι οι hERβ 4 και 5. (Heldring et al. 2007)

Οι ERs κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια, τα ESR1 και ESR2, αντίστοιχα για τους ERα και β, τα οποία και εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (6 και 14 αντίστοιχα) (Deeroo et al. 2006). Παράλληλα, μία μεγάλη ποικιλία από εναλλακτικά μετάγραφα, που οδηγούν σε διαφορετικά mRNA, υπάρχουν τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς ιστούς. Παρολαυτά, επειδή όλα αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα συνήθως συνεκφράζονται μαζί με τον

υποδοχέα αγρίου τύπου, ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία βρίσκεται υπό συνεχή διερεύνηση.



Εικόνα 3: Κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων στο ανθρώπινο σώμα (www.bio.cmu.org)

1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS

A) ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (GENOMIC ACTION) :

1. ΚΛΑΣΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS, ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ

Στις περιπτώσεις που η ορμόνη (δηλαδή ο προσδέτης) απουσιάζει από το κύτταρο, ο υποδοχέας μένει στον πυρήνα του κυττάρου ανενεργός και συνδεδεμένος με κάποιο από τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα απενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών. Μόλις η ορμόνη εμφανιστεί και συνδεθεί με τον υποδοχέα, λαμβάνουν χώρα κάποιες αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του και σηματοδοτείται έτσι, η ενεργοποίησή του. Η ενεργοποίηση αυτή, συνεπάγεται τον ομοδιμερισμό του και τελικά, την αύξηση της συγγένειάς του με συγκεκριμένες περιοχές στο γενετικό υλικό. Οι περιοχές αυτές είναι *cis*-δραστικά στοιχεία και στην περίπτωση των ERS, ονομάζονται EREs (Estrogen Response Elements). Η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία του DNA, έχει τελικώς επιρροή στη μεταγραφή του γονιδίου που φέρει το ERE (η επίδραση συνήθως, είναι επαγωγική).

Αυτού του τύπου η μεταγραφική ενεργότητα του ER, διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των περιοχών AF-1 και AF-2. Η λειτουργία των περιοχών AF, έχει συνεργετική δράση στους περισσότερους προσδετο-ενεργοποιούμενους μηχανισμούς, αλλά ίσως να δρα και ανεξάρτητα σε συγκεκριμένα κύτταρα ή υποδοχείς (Hall et al. 2001).

2. ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΕΡΕ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Εκτός από την κλασική γενωμική δράση των υποδοχέων των οιστρογόνων υπάρχουν και μία σειρά ακόμη δράσεις που σχετίζονται με τη γενωμική δράση των υποδοχέων, παρεκκλίνοντας από τον κλασικό μηχανισμό. Έτσι λοιπόν, έχει δειχθεί ότι η δράση των ERs, μπορεί να λάβει χώρα και μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης- πρωτεΐνης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο και αλληλεπιδρά εν τέλει με το γενετικό υλικό. Με την ικανότητά τους αυτή, οι ERs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση, ενός μεγάλου αριθμού οιστρογόνο-εξαρτώμενων γονιδίων, που όμως δεν περιέχουν EREs. Αυτή η επικοινωνία των μεταγραφικών παραγόντων, αναφέρεται ως «μεταγραφικό cross talk». Παραδείγματα τέτοιου είδους «συνεργασίας» μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων είναι: η ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων από την E2, μέσω της αλληλεπίδρασης του ER με τους μεταγραφικούς παράγοντες Fos και Jun, μέσω του μονοπατιού AP-1. Έχουν εντοπισθεί περισσότεροι τους ενός τρόποι αλληλεπίδρασης του ER με το AP-1 μονοπάτι. Η σύνδεση, λοιπόν μπορεί να γίνεται είτε με τη συμμετοχή των περιοχών πρόσδεσης AF-1 και AF-2, είτε όχι (Kushner, et al. 2000). Σε αυτά τα γονίδια που ρυθμίζονται μεταγραφικά από αυτόν τον μηχανισμό, ανήκουν και: το γονίδιο IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1), τα γονίδια των κολλαγόνων και της κυκλίνης D1. Επιπλέον, μέσω της μεταγραφής που εξαρτάται από AP-1, υπάρχει και η περίπτωση κατασταλτικής δράσης, ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο της χολιν-ακετυλο τρανσφεράσης (συμμετοχή στη βιοσύνθεση της ακετυλο χολίνης των ακετυλοχολινεργικών νευρώνων) Εκτός του μονοπατιού AP-1, υπάρχουν και άλλα παρεμφερή μονοπάτια που σχετίζονται με αυτού του είδους. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που έχουν περιοχές πλούσιες σε GC, μπορούν και αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των οιστρογόνων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Sp1.

Τέλος, σημαντική πληροφορία, αποτελεί και το γεγονός της καταστολής του γονιδίου της IL-6 από την E2, μέσω αλληλεπίδρασης του ER με δύο μεταγραφικούς παράγοντες: Τον NF-κB και τον C/EBP

3.ΜΗ ΠΡΟΣΔΕΤΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ER, ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Σε αντίθεση με την ενεργοποίηση του υποδοχέα από την ορμόνη, είναι επίσης πιθανό ο υποδοχέας των οιστρογόνων να ενεργοποιηθεί χωρίς την ύπαρξη εξωκυτταρικών σημάτων. Αυτά τα δεδομένα, στηρίζονται στο γεγονός ότι κάποιοι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, όπως ο EGF και ο IGF-1, όπως και το κυτταρικό ανάλογο 8-βρωμο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν και να ενεργοποιούν τον ER και να αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Αν και όλα αυτά τα δεδομένα έχουν αποδειχτεί πειραματικά *in vivo*, ακόμη ο βιολογικός ρόλος αυτής της ικανότητας ενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών με τέτοιο τρόπο, δεν είναι σαφής. Ενδεχομένως, να χρησιμοποιείται για την μεταγραφή των γονιδίων αυτών στις περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης E2, όπως υπάρχει στους άνδρες (Hall et al. 2001).

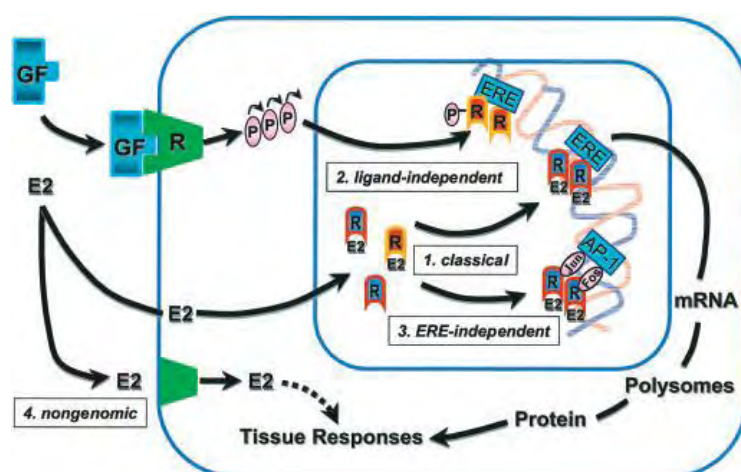
Β) ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (NON- GENOMIC ACTION):

Οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων σχετίζονται με κυτταρικές αποκρίσεις (στο οιστρογονικό σήμα), που όμως είναι πάρα πολύ γρήγορες για να έχουν προκύψει από το μονοπάτι της μεταγραφής- μετάφρασης. Τέτοιες δράσεις είναι παραδείγματος χάριν, όλες οι γρήγορες αποκρίσεις που συμβαίνουν στα οστά, στο νευρικό σύστημα, στην αγγείωση και στους μαστούς (Hall et al. 2001). Οι μη γενωμικές δράσεις λοιπόν, είναι κοινό χαρακτηριστικό των στεροειδών ορμονών και συχνά σχετίζονται με ενεργοποίηση διάφορων μονοπατιών πρωτεϊνικών κινασών.

Η μη γενωμική δράση της E2 έχει δημοσιευθεί να περιλαμβάνει την κίνηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης με σκοπό την παραγωγή cAMP. Αυτό έχει ως επόμενο βήμα στο ενδοκυτταρικό καταρράκτη μεταγωγής του σήματος, να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση δια μέσου MAPK. Ένα άλλο μονοπάτι που ενεργοποιείται, είναι αυτό της PI3-κινάσης (σε ενδοθηλιακά, καρκινικά κύτταρα του μαστού και ηπατοκύτταρα) (Bjornstrom et al. 2005). Τέλος, οι μη γενωμικές αυτές δράσεις λαμβάνουν χώρα με την ενεργοποίηση διαφορετικών ισομορφών των ERs, οι οποίοι εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και είναι συνήθως συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPR30), όπως και με μία κινάση τυροσίνης.

Μερικές από τις μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων περιλαμβάνουν:

- Την αγγειοπροστατευτική δράση της E2, δια μέσου του ER και της ενεργοποίησης της διφασικής ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής NOS (eNOS) από τα οιστρογόνα μέσω του μονοπατιού MAPK και PI3K/Akt.
- Την εμπλοκή στον πολλαπλασιασμό και την αντιαποπτωτική δράση στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες δια μέσου και πάλι του μονοπατιού των MAP κινασών (Hall et al. 2001).



Εικόνα 4: Οι διάφοροι μηχανισμοί δράσης της οιστραδιόλης και της σηματοδότησης μέσω υποδοχών οιστρογόνων. Το βιολογικό αποτέλεσμα της οιστραδιόλης, διαμεσολαβείται από τουλάχιστον τέσσερα μονοπάτια του υποδοχέα των οιστρογόνων. (Hall et al. 2001)

Γ) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Τα μιτοχόνδρια παίζουν εξαιρετικά σπουδαίο ρόλο στην εύρυθμη και ομαλή λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση του ίδιου του οργανισμού. Οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν περιλαμβάνουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση. Μάλιστα, δεν είναι λίγα τα νοσήματα, τα οποία σχετίζονται με μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, ορισμένα από τα οποία είναι και ιδιαίτερα σοβαρά, όπως διάφορες νευρομυοπάθειες, κάποιες μορφές σακχαρώδους διαβήτη συνδυαζόμενες με κώφωση, εγκεφαλοπάθειες και λοιπά (Razmara et al. 2008).

Επιπλέον, είναι ευρέως γνωστό, ότι τα μιτοχόνδρια, έχουν το δικό τους γενετικό υλικό, από το οποίο και εκφράζουν κάποιες από τις πρωτεΐνες που χρειάζονται πλην όμως, εξαρτώνται και από το πυρηνικό γενετικό υλικό. Η σηματοδότηση μέσω οιστρογόνων, έχει φανεί, πως διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, από το DNA του πυρήνα (Pedram et al.2006). Εκτός, όμως αυτής της σχέσης της δράσης των ERs με τα οιστρογόνα, οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται να εντοπίζονται και τοπολογικά εντός των μιτοχονδρίων, μετατοπιζόμενοι σε αυτά ύστερα από κάποια ερεθίσματα. Παραδείγματος χάριν, τόσο ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) όσο και υποδοχέας των οιστρογόνων (ER) μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια και ρυθμίζουν την επαναπρόσληψη του Ca^{2+} και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Αναλογιζόμενοι δε, το αποτέλεσμα της μη ελεγχόμενης παραγωγής τόσο το ασβεστίου όσο και των ROS, αντιλαμβανόμαστε τη δυνητική δράση των υποδοχέων αυτών στα γεγονότα της απόπτωσης και στην προστασία από το οξειδωτικό στρες (Picard et al.2014).

Αν και ακόμη δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένοι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων όλα αυτά πραγματοποιούνται, εν τούτοις υπάρχουν ενδείξεις της κατασταλτικής δράσης της παραγωγής ROS, μέσω σηματοδότησης διαμεσολαβούμενης από την E2, όπως και της απευθείας ρύθμιση της μεταγραφής του μιτοχονδριακού DNA, με μηχανισμούς όμοιους με αυτούς των πυρηνικών υποδοχέων.

Τέλος, ένα ιδιαίτερα σημαντικό μιτοχονδριακό ένζυμο που σχετίζεται με τη χρόνια επίδραση των οιστρογόνων και της σηματοδότησής τους, είναι η μιτοχονδριακής μαγγανικής δισμουτάσης σουπεροξειδίου, MnSOD, η οποία έχει εμφανιστεί να αυξάνεται με τη χρόνια επίδραση των οιστρογόνων, εξηγώντας έτσι την επίδραση των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια και την αντιοξειδωτική τους δράση, σε μοριακό επίπεδο (Pedram et al.2006).

1.3.3 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ: ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν τις μη γενωμικές με τις γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων. Η δράση πολλών μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλιώσεων, που πραγματοποιούνται από κινάσες. Σε αυτού του τύπου τη μη γενωμική- γενωμική δράση των οιστρογόνων, υπάρχει η πρόσδεση των

ενεργοποιημένων οιστρογονικών υποδοχέων σε διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία στο γενετικό υλικό. Χαρακτηριστικό του μηχανισμού αυτού- σε αντίθεση με το γενωμικό μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος από ERE, είναι ότι συμπεριλαμβάνει και την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. (Bjornstrom and Sjoberg, 2005)

Σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση από τις MAPK είναι ο Elk-1, C/EBP και ο CREB (cAMP response element (CRE) binding protein). Σε αυτό το μονοπάτι μεταγωγής σήματος, λαμβάνουν χώρα δύο πολύ βασικές διαδικασίες: 1) η φωσφορυλίωση της Elk-1 η οποία εξαρτάται από την οιστραδιόλη και 2) η ενεργοποίηση των SRE (serum response elements), από έναν μηχανισμό που εξαρτάται από τους ERs και περιλαμβάνουν την δράση των MAPK. Ουσιαστικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες C/EBP και CREB φωσφορυλιώνονται από μία (ενεργοποιημένη από την οιστραδιόλη) MAPK και οδηγούν στην μεταγραφή γονιδίων που έχουν CREs. Φυσιολογικά, εκτός από τη διαμεσολαβούμενη από τις MAPKs φωσφορυλίωση, ο CREB είναι στόχος φωσφορυλίωσης της cAMP/ πρωτεϊνικής κινάσης A, γνωστή και ως PKA. Παρά όλα αυτά, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ενδεχομένως να ενεργοποιείται και από την οιστραδιόλη μέσω της επαγόμενης παραγωγής cAMP (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

Συμπερασματικά λοιπόν, σε αυτού του τύπου cross-talk μηχανισμών δράσης των υποδοχέων των οιστρογόνων, μπορούμε να αντιληφθούμε την μεγάλη επίδραση της σηματοδότησης της οιστραδιόλης σε μία μεγάλη ποικιλία γονιδίων, συμπεριλαμβάνοντας τώρα και τον μεγάλο αριθμό των γονιδίων που έχουν CREs.

1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ B- ERB

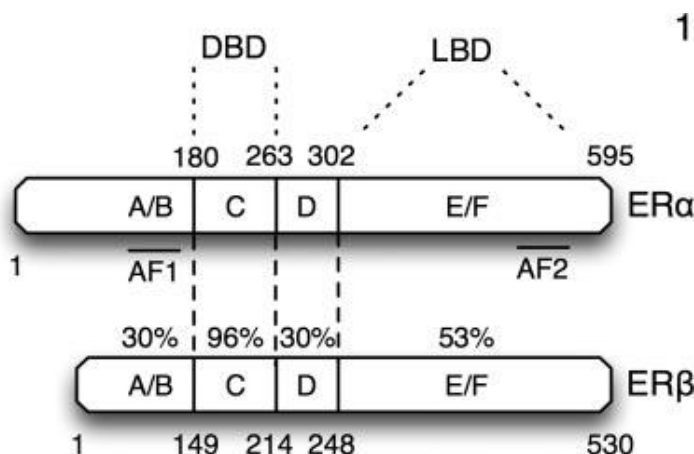
Ο ERβ εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 14q22-24 (Koutsilieris et al. 2014). Η ισομορφή αυτή του υποδοχέα των οιστρογόνων, ανακαλύφθηκε το 1996 και έκτοτε προξενεί μεγάλο ενδιαφέρον για τους ρόλους και τη δράση του (Deroo and Buensucseso, 2010). Από κλινικής άποψης, ο ERβ αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τις πρότυπες ενδοκρινικές θεραπείες που εφαρμόζονται σε ορμονοεξαρτώμενους -συνήθως γυναικολογικούς καρκίνους, όπως είναι η ταμοξιφένη. Επιπλέον, ο υποδοχέας αυτός, θεωρείται ότι έχει «αντι-πολλαπλασιαστικά» αποτελέσματα σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών μοντέλων, μεταξύ των οποίων και το γλοίωμα (Manente et al. 2013). Ακόμη, αποτελεί έναν δυνητικό στόχο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και στρατηγικές για την καταπολέμηση της ενδοκρινικής αντίστασης που εμφανίζεται έπειτα από συνεχόμενη χορήγηση ταμοξιφένης. (Hodges-Gallagher et al. 2008)

Αγωνιστές του ERβ, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του mRNA του γονιδίου της υδροξυλάσης 1 της τρυπτοφάνης (βιοσύνθεση και μεταβολισμός της σεροτονίνης) στα κύτταρα των πυρήνων της ραφής (αρχή σεροτονεργικών νευρώνων), αυξάνοντας ουσιαστικά την σεροτονεργική δραστηριότητα και έχοντας κατ' επέκταση αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα! Επιπλέον οι υποδοχείς της σεροτονίνης ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα με ένα τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από τον ERβ (Prasenhjit Dey, et al. 2013).

Από άποψη δράσης, οι δύο ισομορφές των υποδοχέων αυτών μπορούν να δημιουργήσουν ετεροδιμερή, όταν συνεκφράζονται. Αυτό που όμως είναι σημαντικό, είναι η ικανότητα που έχει ο ERβ να τροποποιεί την μεταγραφική ενεργότητα του ERα. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί, ότι ο ERβ καταστέλλει τη δράση του ERα, στους υποδοχείς των γονιδίων εκείνων, που περιέχουν περιοχές AP-1 και CRE. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι και αυτό της κυκλίνης D1. Τοπολογικά, μέσα στο κύτταρο, ομοίως με τον ERα, εντοπίζεται στην πυρηνική του μορφή, αλλά και στη μεμβρανική. Τέλος, ERβ εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, λόγω μετατόπισης του πυρηνικού ή μεμβρανικού υποδοχέα. (Hodges-Gallagher et al. 2008)

Γενικά, ο ERβ, όντας υποδοχέας οιστρογόνων έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τον ERα. Παράλληλα, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, (cross talk), έχοντας επίδραση στη μεταγραφή διάφορων γονιδίων, αλλά και άλλες πιο άμεσες αποκρίσεις. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης, είναι η επίδραση που έχει ο ERβ, στη σηματοδότηση του NFκ-B. Ουσιαστικά, ο ERβ, έχει αρνητική επίδραση ως προς τη μεταγραφική ενεργότητα του NFκ-B, αποτρέποντας τη δράση του. Η αρνητική αυτή επιρροή του ERβ είναι προσδετοεξαρτώμενη. Παράλληλα δε, η σχέση αυτή μεταξύ ERβ και NFκ-B, είναι αμφίπλευρη, εφόσον έχει αποδειχθεί, πως και ο NFκ-B μπορεί να περιορίσει- αποτρέψει τη δράση του ERβ (Deroo and Buensuceso, 2010).

Από φαρμακολογικής άποψης, έχει δειχθεί ότι ο ERβ ενισχύει την αντιοιστρογονική δράση ευρέως χορηγούμενων αντιοιστρογόνων (ταμοξιφένη, ραλοξιφένη), ελέγχοντας αποπτωτικούς μηχανισμούς και τον κυτταρικό κύκλο (Hodges-Gallagher et al. 2008).



Εικόνα 5: Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών, μεταξύ ERα και ERβ (Deroo and Buensuceso, 2010)

Ο ERβ τέλος, αποτελεί έναν σημαντικό διαμεσολαβητή της οιστρογονικής δραστηριότητας στο ΚΝΣ, αποτελώντας έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο για την καλύτερη αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών και νευρολογικών παθήσεων όπως η σκλήρυνση κατά

πλάκας (MS), η νόσος Πάρκινσον (PD), η νόσος Αλτςχάιμερ (AD) και κάποιες διατροφικές διαταραχές (Dey, et al. 2013).

1.3.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ) ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Γενικά οι υποδοχείς των οιστρογόνων, τόσο ο α - όσο και ο β - φαίνεται να επηρεάζουν τον εγκέφαλο με διάφορους τρόπους. **Συγκεκριμένα και οι δύο τύποι υποδοχέων, εμφανίζονται να έχουν νευροπροστατευτική δράση.** Παραδείγματος χάριν ο ER β στον παρακοιλιακό πυρήνα και στον κεφαλοκοιλιοπλευρικό μυελό, προστατεύει από την υπέρταση η οποία επάγεται από τα την αυξημένη συγκέντρωση αλάτων, ως αποτέλεσμα της δράσης της αλδοστερόνης. (Prasenjti Dey, et al. 2013)

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται η κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων α - και β - στον εγκέφαλο, καθώς και του ορφανού υποδοχέα GPR30, ενός μεμβρανικού υποδοχέα συνδεδεμένου με G πρωτεΐνες, οποίος προκαλεί γρήγορη οιστρογονική, μη -γενωμική δράση ανεξάρτητα από τους κλασικούς υποδοχείς των οιστρογόνων α και β . Επιπλέον, παρουσιάζεται και ο ER-X, μία κατά κύριο λόγο εμβρυική μορφή του ER που είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στους ενήλικες (Cui et al. 2013).

ER subtypes	Distribution in the brain (b)			
	intense	moderate	weak	Absent
ER α	Amygdala; Bed nucleus of the stria terminalis; Periaqueductal gray; Preoptic area.	Allocortex; Hypothalamus; Locus coeruleus; Spinal trigeminal nucleus	Hippocampus; Raphe nuclei; Zona incerta.	Anterior tegmental nucleus; Cerebellum; Globus pallidus; Inferior olive nucleus; Isocortex; Pontine nuclei; Thalamus; Substantia nigra; Superior olive nucleus; Ventral tegmental area.
ER β	Amygdala; Bed nucleus of the stria terminalis; Raphe nuclei; Substantia nigra.	Allocortex; Globus pallidus; Hippocampus; Locus coeruleus; Preoptic area; Ventral tegmental area;	Anterior tegmental nucleus; Hypothalamus; Inferior olive nucleus; Isocortex; Periaqueductal gray; Pontine nuclei; Spinal trigeminal nucleus; Superior olive nucleus; Thalamus.	Cerebellum; Zona incerta.
GPR30	Allocortex; Anterior tegmental nucleus; Cerebellum; Hippocampus; Hypothalamus; Isocortex; Locus coeruleus; Pontine nuclei; Preoptic area; Spinal trigeminal nucleus; Superior olive nucleus.	Periaqueductal gray.	Amygdala; Bed nucleus of the stria terminalis; Raphe nuclei; Substantia nigra (reticular);	Ventral tegmental area
ER-X	enriched in the fetal baboon brain and the neocortex of the postnatal rodent. ; almost undetectable in the normal adult			

Πίνακας 1: Η κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων στον εγκέφαλο. (Cui et al. 2013)

1.3.6 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ΕΡΒ) ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, οι υποδοχείς των οιστρογόνων παίζουν έναν αρκετά σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου, του νευρικού συστήματος και εν ολίγοις ολόκληρου του οργανισμού. Έτσι, θεωρείται απόλυτα λογικό ότι η έλλειψή τους, η παθολογική τους κατανομή και γενικά οι οποιεσδήποτε διαταραχές στη συγκέντρωσή τους θα παίζουν καίριο ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών. Επειδή, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ασχοληθήκαμε κυρίως με τη δράση των οιστρογόνων και τις διακυμάνσεις διάφορων μορίων σε σχέση με την παρουσία ή όχι οιστρογόνων, σε νευρικά κύτταρα, θα γίνει παρακάτω μία αναφορά για τη συμμετοχή του ΕΡβ (κυρίως) στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και κυρίως στη νόσο Alzheimer.

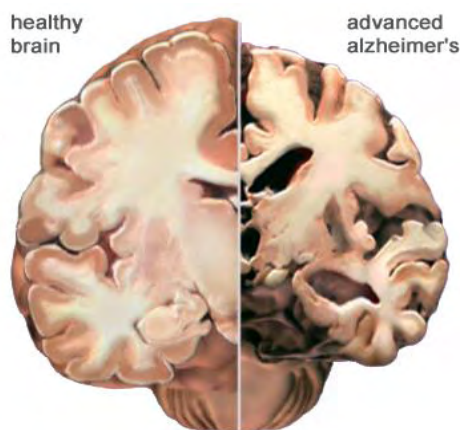
Στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ένας από τους μηχανισμούς προόδου και βλάβης των υγείων νευρώνων, σε μία περιοχή όπου υπάρχουν ήδη αλλοιώσεις, είναι η υπερενεργητικότητα της μικρογλοίας. Τα κύτταρα της μικρογλοίας είναι υπεύθυνα για τον εντοπισμό και τη θανάτωση ασθενικών ή ξένων κυττάρων, εκκρίνοντας κυτοκίνες. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι πολύ πιθανό να βλαφτούν και υγιή κύτταρα. Σημαντικό είναι δε, να αναφερθεί ότι ο ΕΡβ και όχι ο ΕΡα εκφράζεται στη μικρογλοία και οι ΕΡβ επιλεκτικοί προσδέτες μπορούν να αποτρέψουν την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, την έκκριση κυτοκινών και κατ' επέκταση την φλεγμονή και ενδεχόμενη καταστροφή του νευρικού ιστού (Dey et al. 2013).

Όσον αφορά τη νόσο Alzheimer (AD), η οποία αποτελεί τη Νο1 αιτία άνοιας παγκοσμίως, ξεχωρίζουν κάποια πολύ συγκεκριμένα κλινικά και νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά:

α) σε μικροσκοπικό επίπεδο εντοπίζονται νευροϊνιδιακοί σωροί (NFT) δηλαδή, νευροϊνιδιακά συμπλέγματα που αποτελούνται από ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις ανώμαλων ινιδίων με ζευγαρωτή ελικοειδή δομή με κύριο συστατικό την **πρωτεΐνη τ**, η οποία έχει υποστεί ανώμαλη φωσφορυλίωση καθώς και αμυλοειδείς πλάκες, δηλαδή, πυκνές και αδιάλυτες εναποθέσεις πρωτεϊνών και κυτταρικών συστατικών έξω και γύρω από τους νευρώνες του εγκεφάλου. Περιέχουν δε, μεγάλα ποσά αδιάλυτου β-αμυλοειδούς ανακατεμένα με τμήματα νευρώνων και μη νευρικών κυττάρων, όπως μικρογλοία και αστροκύτταρα. (J. Deroo et al. 2006, Νευροεπιστήμες και Συμπεριφορά, Α. Ζίφα, 2012). Τέλος, παρατηρείται μεγάλος εκφυλισμός των συνάψεων και των νευρώνων που σχετίζονται με χολινεργική δραστηριότητα.

Σε μακροσκοπικό επίπεδο, ως αποτέλεσμα του σταδιακού νευροεκφυλισμού, παρατηρείται ατροφία του φλοιού του εγκεφάλου και διερεύνηση των αυλάκων.

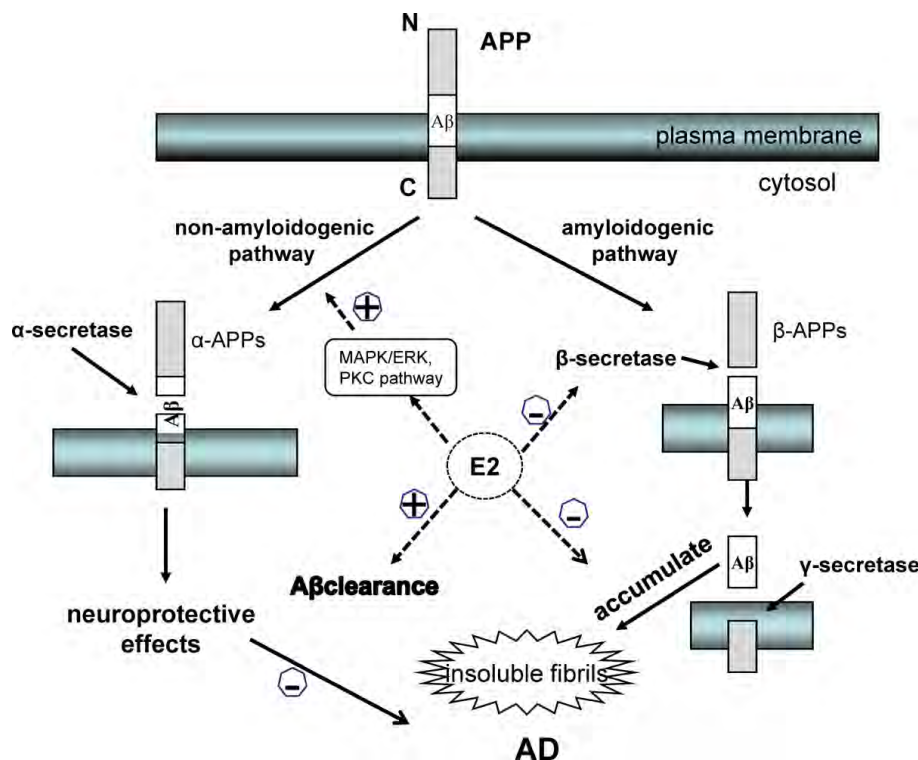
Αναφορικά με την κλινική εικόνα, η οποία είναι τις περισσότερες φορές ιδιαίτερα σαφής, περιλαμβάνονται συμπτώματα όπως η σταδιακή και προοδευτική απώλεια μνήμης (κύριο χαρακτηριστικό της νόσου), καθώς και η απώλεια της λεκτικής ικανότητας και της ικανότητας προσανατολισμού του ατόμου (Grimm et al. 2012).



Εικόνα 6: Αναπαράσταση και συγκριτική απεικόνιση υγιούς εγκεφάλου σε σχέση με εγκεφαλοασθενούς με προχωρημένο AD. Φαίνεται ξεκάθαρα το μακροσκοπικό αποτέλεσμα του νευροεκφυλισμού που οδηγεί σε μείωση του εγκεφαλικού όγκου και ιστού και σε χαλάρωμα - απομάκρυνση των εγκεφαλικών αυλακών. (www.alz.org)

Σε όλη αυτή την αχανή, για τα σημερινά δεδομένα, εικόνα της παθογένειας αλλά και της αντιμετώπισης της νόσου Alzheimer, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν τα οιστρογόνα (Grimm et al. 2012, Crawford, 1998, Fitzpatrick et al. 2002, Liu et al. 2005, Deroo et al. 2006). Αναφέρεται συγκεκριμένα, ότι μετεμνησπαυσικές γυναίκες που λαμβάνουν ορμονική αντικατάσταση με οιστρογόνα, έχουν λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν μετέπειτα τη νόσο. Επιπλέον, η οιστρογονική αντικατάσταση μπορεί να βελτιώσει τη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη γυναικών που πάσχουν από AD ή ακόμη και να καθυστερήσει την ανάπτυξη της νόσου (Liu et al. 2005, Deroo et al. 2006).

Σε περισσότερο μοριακό επίπεδο, φαίνεται πως το αμυλοειδές πεπτίδιο Αβ, που εναποτίθεται στις αμυλοειδείς πλάκες, καθώς και η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης τ, μπορούν να τροποποιήσουν τα επίπεδα των νευροστεροειδών (τα οποία είναι ουσιαστικά τα νευροενεργά στεροειδή που συντίθενται εντός του νευρικού συστήματος και είναι ανεξάρτητα από τους ενδοκρινείς αδένες της περιφέρειας). Όπως προαναφέραμε, τα οιστρογόνα φαίνεται να μειώνουν το ρίσκο ή τη σοβαρότητα της νόσου μέσω μείωσης του οξειδωτικού στρες, μείωση της αιματικής ροής του εγκεφάλου και μείωση της μεταφοράς γλυκόζης. Έκτος της δράσης που έχουν στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, μπορούν επίσης να επηρεάζουν το χολινεργικό, σεροτενεργικό και νορ-αδρενεργικό σύστημα νευροδιαβίβασης. Ακόμη, εμπλέκονται και στην αποτροπή εκφυλισμού των συνάψεων και των περιφερικών δενδριτών που συμβαίνει κατά την πρόοδο της νόσου (Grimm et al. 2012).



Εικόνα 7 :Τα οιστρογόνα προλαμβάνουν τη συσσώρευση του αμυλοειδούς Αβ:

Ουσιαστικά, μπορούν να μειώσουν την παραγωγή Αβ, ευνοώντας το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι της APP (Amyloid Precursor Protein), η οποία υφίσταται επεξεργασία μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK/ERK ή PKC, ενώ παράλληλα προωθείται η εκκαθάριση του Αβ μέσω διαφορετικών τρόπων. Ένας από αυτούς είναι η παρακίνηση της μικρογλοϊκής φαγοκύττωσης ή η καταστροφή τους καθώς και η ρύθμιση των επιπέδων των κύριων ενζύμων που εμπλέκονται στην αποσύνθεσή τους (Cui et al. 2013).

1.4 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Ήδη, σε ορισμένα σημεία, έχει γίνει αναφορά στη δράση που έχουν τα οιστρογόνα, μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα τους. Παρακάτω, θα αναφερθούμε πιο συγκεκριμένα στη χημεία- βιοχημεία τους, στην ποικιλία τους, στη δράση τους και τελικώς, θα γίνει επίσης λόγος για το αργίλιο, που αποτελεί κύριο ερευνητικό πεδίο της συγκεκριμένης εργασίας και που ανήκει στα λεγόμενα μεταλλοοιστρογόνα.

Τα οιστρογόνα, λοιπόν, μαζί με τα αλατοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, την προγεστερόνη και τα γλυκοκορτικοειδή, ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των στεροειδών ορμονών και έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Τα σημαντικότερα οιστρογόνα που παράγονται από το σώμα είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) και οι δύο μεταβολίτες αυτής: η οιστρόνη (E1) και η εστριόλη (E3). Και τα τρία αυτά είδη των οιστρογόνων είναι προσδέτες υψηλής συγγένειας των υποδοχέων των οιστρογόνων, αν και η E2 είναι ο ισχυρότερος αγωνιστής. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες της E2 αν και παλαιότερα ήταν ευρέως αποδεκτό ότι είναι ανενεργοί, σήμερα πολλά στοιχεία υπονοούν την ιστοειδική τους δράση (Heldring et al. 2007)

Σε μοριακό επίπεδο ο ρόλος τους είναι η σύνδεση με τις διάφορες μορφές των υποδοχέων των οιστρογόνων, πυροδοτώντας έτσι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται οι υποδοχείς των οιστρογόνων και αναλόγως την περίπτωση (γενωμική-μη γενωμική δράση), θα οδηγηθεί το κύτταρο σε έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ή σε άλλες τροποποιήσεις των κυτταρικών συστατικών και των πρωτεϊνών του, σε αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, σε διακυτταρική επικοινωνία και λοιπά. (Sjoberg et al. 2006)

Τα οιστρογόνα παίζουν έναν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη ολόκληρου του ανθρώπινου οργανισμού, σε έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διαδικασιών και σε διάφορα στάδια της ζωής. Εμπλέκονται στην αύξηση και στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, στον καθορισμό και στη διατήρηση του φύλου και την υγιούς αναπαραγωγικής λειτουργίας (Heldring et al 2007). Παράλληλα, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες, λαμβάνουν μέρος σε μία πληθώρα βιολογικών δράσεων, στο καρδιαγγειακό, στο ανοσοποιητικό, στο μυοσκελετικό, στο νευρικό σύστημα, στην συμπεριφορά κ.α (Korach et al.2006).

Εξίσου καίριο ρόλο έχει φανεί ότι διαδραματίζουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος- κυρίως του μαστού, των ωοθηκών και του ενδομητρίου (όπου και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως ορμονοεξαρτώμενοι καρκίνοι)- χωρίς αυτό να είναι απόλυτο, φαίνεται πως έχουν εμπλοκή και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του προστάτη. Εκτός από το ρόλο που παίζουν στην ογκογένεση, έχουν ενοχοποιηθεί-ή τουλάχιστον έχουν εντοπιστεί μειωμένα ή αυξημένα επίπεδα και σε πολλές άλλες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης, του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, της αντίστασης στην ινσουλίνη, των καρδιαγγειακών προβλημάτων, της ενδομητρίωσης και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος Parkinson (PD), το εγκεφαλικό και η νόσος Alzheimer (AD) (Korach et al.2006)

Συγκεκριμένα, στο νευρικό σύστημα, ως ενεργές στεροειδείς ορμόνες δρουν τα νευροστεροειδή, χημικά όμοια με τα υπόλοιπα στεροειδή, απλώς βιο-συντίθενται στο νευρικό σύστημα και όχι στους ενδοκρινείς αδένες (A. Grimm et al. 2012). Ο ρόλος λοιπόν, της 17β-οιστραδιόλης φαίνεται να έχει νευροπροστατευτική δράση. Η ορμόνη αυτή έχει θετική επίδραση στη ρύθμιση της φλεγμονής, του τραύματος (στο ΚΝΣ), της ισχαιμίας, του νευροεκφυλισμού και των γνωστικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά την πάροδο των ετών και την αύξηση της βιολογικής ηλικίας του ατόμου και κατά τις διάφορες νευρολογικές διαταραχές (Pietranera, et al. 2014).

1.4.1 ΑΛΛΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα οιστρογόνα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι στεροειδείς ορμόνες με ρόλο μεγίστης σημασίας σε όλον τον οργανισμό. Παράλληλα, είναι φυσικό μέσα στα άπειρα φυσικά και τεχνητά μόρια που υπάρχουν στο περιβάλλον με το οποίο συνεχώς αλληλεπιδρά ο άνθρωπος, να υπάρχουν και κάποια μόρια που μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων. Τα μόρια αυτά μπορεί να προέρχονται από τα φυτά, να είναι δηλαδή

φυτοοιστρογόνα, όπως κάποιες ισοβλαβόνες και οι μεταβολίτες τους ή μπορεί να είναι τεχνητά οιστρογόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική ή την κοσμετολογία, καθώς και τέλος, άλλα παράγωγα χημικών ουσιών (Watson et al. 2012).

Όλα αυτά τα είδη των οιστρογόνων λόγω του χαμηλού μοριακού τους βάρους και των υδρόφιλων συστατικών που διατίθενται στα σκευάσματα όπου αυτά συναντιούνται, τα κάνουν εξαιρετικά ευδιάλυτα κατά την επαφή τους με το νερό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες στους υδροφόρους ορίζοντες και στο πόσιμο νερό. Επιπλέον, ο άνθρωπος μπορεί να έρθει σε επαφή με αυτά και από άλλες αμεσότερες πηγές, όπως η τροφή του, τα είδη προσωπικής υγιεινής, φαρμακευτικά προϊόντα, φυτοφάρμακα εντομοκτόνα, καθώς και καλλυντικά (Watson et al. 2012).

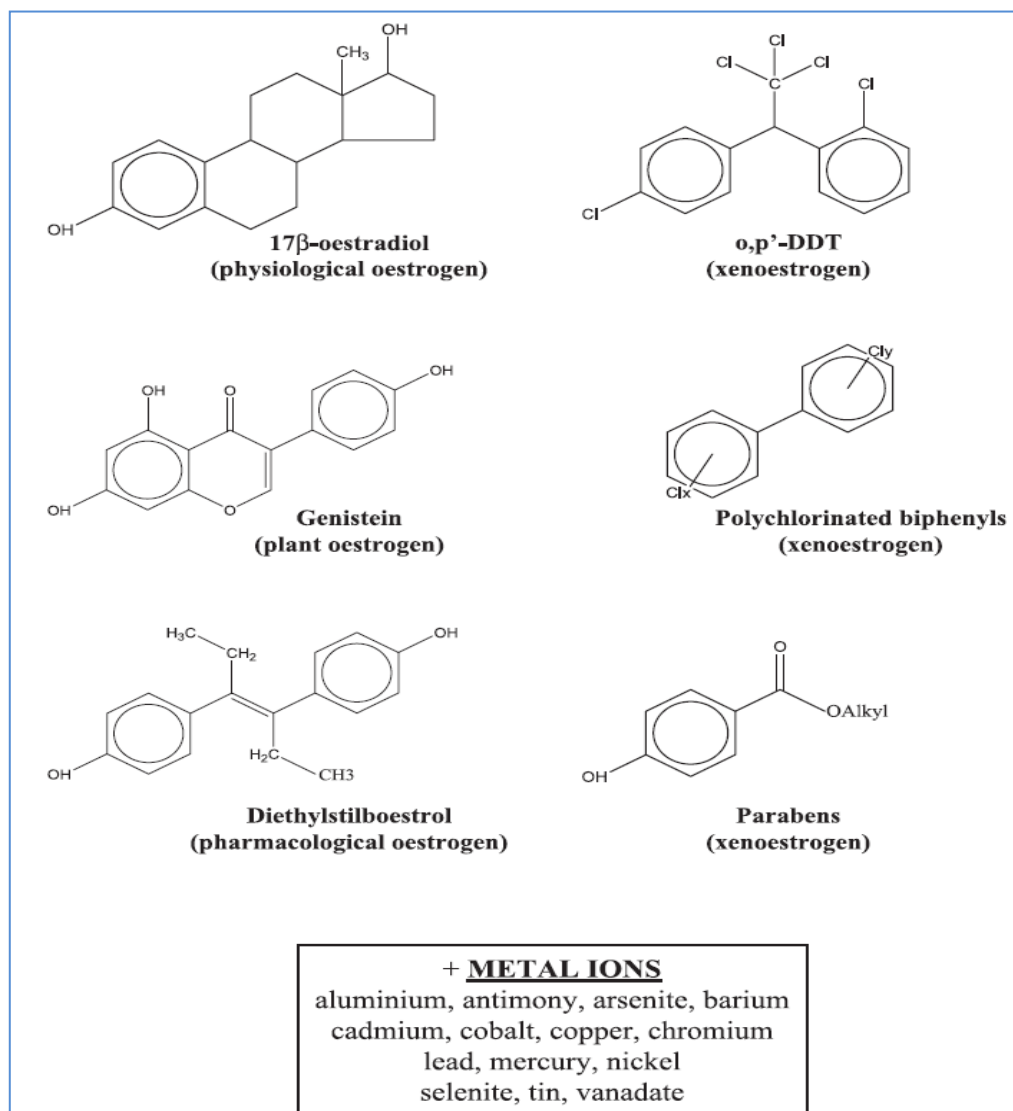
Τα οιστρογόνα που βρίσκουν εφαρμογή στην ιατρική και τη φαρμακευτική χρησιμοποιούνται ευρύτατα, και είναι ουσίες όπως η αιθυνιλ-οιστραδιόλη, η διεθυλοιστραδιόλη (DES) και η μεστρανόλη, που αποτελούν ορμονικά αντισυλληπτικά, η ταμοξιφένη και άλλα αντι-οιστρογονικά φάρμακα που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους και τέλος, πληθώρα άλλων ουσιών που χορηγούνται για ορμονική αντικατάσταση σε μετεμμηνοπαυσικές γυναίκες (Watson et al. 2012). Τέλος, μία σημαντική κατηγορία φαρμακευτικών οιστρογόνων είναι τα SERMs (Selective Estrogen Receptors Modulators).

1.4.2 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ- ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα ξενοοιστρογόνα (xenoestrogens) είναι γενικώς γνωστά ως τεχνητά, μη στεροειδή οργανικά μόρια τα οποία έχουν περάσει στο περιβάλλον από αγροτικούς ψεκασμούς, βιομηχανικές επεξεργασίες, τοξικά απόβλητα συμπεριλαμβανομένων οργανοχλωρινικών εντομοκτόνων, πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, αλκυλφαινολών και parabens (συστατικό πολλών προϊόντων σωματικής υγιεινής που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση). Τα χημικά αυτά είναι γνωστά ως ενδοκρινικοί διαταράκτες και η επίδραση που έχουν στην ανθρώπινη υγεία βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα. Τα περισσότερα από αυτά τα οργανικά μόρια με οιστρογονική δράση φέρουν συχνά φαινολικούς ή άλλους δακτυλίους, οι οποίοι συμβάλλουν στην απόκτηση της οιστρογονικής ιδιότητάς τους, δια μέσου διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με τις αμινοξικές αλυσίδες του ER (Darbre, 2005).

Μια υποκατηγορία των ανόργανων ξενοοιστρογόνων αποτελούν και κάποια μέταλλα που έχουν τη ικανότητα να τροποποιούν μειώνοντας ή αυξάνοντας την οιστρογονική δράση, ή να προσομοιάζουν το σήμα των οιστρογόνων, διαμορφώνοντας μία νέα τάξη ενδοκρινικών διαταρακτών, που ονομάζονται μεταλλοοιστρογόνα. (Darbre, 2005) και που σχετικά πρόσφατα έχει αποδειχθεί η ικανότητά τους να εμπλέκονται σε αυτού του τύπου τη σηματοδότηση.

Τα μεταλλοοιστρογόνα περιλαμβάνουν τόσο ανιόντα όσο και κατίοντα. Μερικά παραδείγματα αυτών όσο και άλλων τεχνητών οιστρογόνων και ξενοοιστρογόνων παρουσιάζονται στην εικόνα παρακάτω:



Εικόνα 6: E2 και η χημική δομή άλλων φύτο, φάρμακο-και ξενοοιστρογόνων. Στον πίνακα παρατίθενται τα μεταλλοοιστρογόνα. Darbre J. Appl. Toxicol. 2006; **26**: 191–197

1.4.3 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, ο ER είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος σχηματίζει δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) και επομένως η δράση του στηρίζεται στη σχέση πρωτεΐνης-μετάλλου. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία δομή που περιλαμβάνει δύο δάκτυλα ψευδαργύρου, όπου το κάθε ένα σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες δύο ζευγαριών κυστεϊνικών καταλοίπων που συνδέονται με ένα άτομο ψευδαργύρου. Η σύνδεση οιστρογόνου- ER, γίνεται στο LBD (Ligand Binding Domain), κατόπιν, ο υποδοχέας διμερίζεται και δια μέσω των δακτύλων ψευδαργύρου αλληλεπιδρά με τα στοιχεία EREs (Estrogen Response Elements) στο DNA επηρεάζοντας τη μεταγραφική τύχη τόσο των γονιδίων που φέρουν τα στοιχεία αυτά ή μέσω άλλων μηχανισμών ακόμη περισσότερα γονίδια (βλ. παραπάνω, μηχανισμούς δράσης) (Darbre, 2006).

Τα διάφορα μέταλλα που έχουν δράση μεταλλοιστρογόνων έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη δράση του ER με ποικίλους τρόπους. Κάποια μπορεί να πάρουν τη θέση του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ικανότητα του DBD να προσδένεται σε κάποιο ERE. Κάποια άλλα μέταλλα έχουν την ικανότητα να προσδένονται με το LBD και κατά συνέπεια να αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την 17β-οιστραδιόλη. (Darbre, 2006)

1.4.4 ALUMINUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ ΥΔΡΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΑΡΓΙΛΙΟ (ALUMINUM CHLORHYDRATE, ACH)

Το Aluminum (αργίλιο), είναι ένα από τα μεταλλοιστρογόνα και μελετάται ευρέως η δράση του λόγω της συχνής επαφής του με τον άνθρωπο μέσω της κοσμετολογίας και των προϊόντων προσωπικής υγιεινής. Στη συγκεκριμένη εργασία θα εξεταστεί η οιστρογονική δράση που έχει το Aluminum Chlorhydrate και γενικότερα η δράση του σε βιοχημικές, κυτταρικές διαδικασίες, οι οποίες υπόκεινται μεταξύ άλλων και σε οιστρογονικό έλεγχο, σε νευρικά κύτταρα. Μία τέτοια βιοχημική διεργασία, όπως προαναφέρθηκε είναι η αντιοξειδωτική άμυνα, η οποία ενισχύεται από τη δράση των οιστρογόνων.

Γενικά τα άλατα αλουμινίου έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή σου στον μηχανισμό ανάπτυξης διάφορων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως η νόσος Alzheimer, νόσος Parkinson και λοιπά.

Τα άλατα του αργιλίου, όπως και το ACH, προστίθεται ως κύριο ενεργό συστατικό στην παρασκευή αποσμητικών, έχοντας αντι-ιδρωτική δράση (antiperspirant). Η προσθήκη τους μάλιστα, γίνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 25% w/v, έχοντας ως συνέπεια τα αποσμητικά να αποτελούν μία πηγή υψηλής έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε ACH. Παρά τα όσα έχουν ειπωθεί, δεν είναι ακόμη γνωστά τα αποτελέσματα από μακροχρόνια και ευρεία έκθεση πληθυσμών σε ACH, υπάρχουν όμως πολλά δεδομένα που λόγο και της μεταλλοιστρογονικής του ιδιότητας, το συσχετίζουν με ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Darbre, 2006), καθώς και με νευροεκφυλιστικές διαταραχές και κυρίως με τη νόσο Alzheimer.

Ο τρόπος με τον οποίον ένας οργανισμός μπορεί να εκτεθεί στα άλατα αργιλίου είναι μέσω της απορρόφησής τους από το δέρμα με την εφαρμογή του αποσμητικού. Το άλας (που δρα φράσσοντας τους πόρους, αποτρέποντας έτσι τον ιδρώτα να εξέλθει) απορροφάται από τη dermίδα και κατόπιν διίσταται στους παρακείμενους ιστούς καθώς και στο αίμα (Darbre, 2006) .

Θεωρητικά, ο κίνδυνος συνεχόμενης απορρόφησης του ACH υπάρχει εάν στην περιοχή κάτω από το μπράτσο η επιδερμίδα δεν είναι ανέπαφη, εφόσον η αυτή, θεωρείται* αποτελεσματικός φραγμός για την απορρόφηση των αλάτων. Αν μάλιστα αναλογιστούμε την συνήθεια που επικρατεί στις δυτικές κοινωνίες να εφαρμόζεται αποσμητικό μετά από το ξύρισμα ή την αποτρίχωση, ο κίνδυνος απορρόφησης του άλατος αυξάνεται δραματικά, λόγω των μικροτραυματισμών ή την αφαίρεση πολλές φορές της βασικής στοιβάδας της

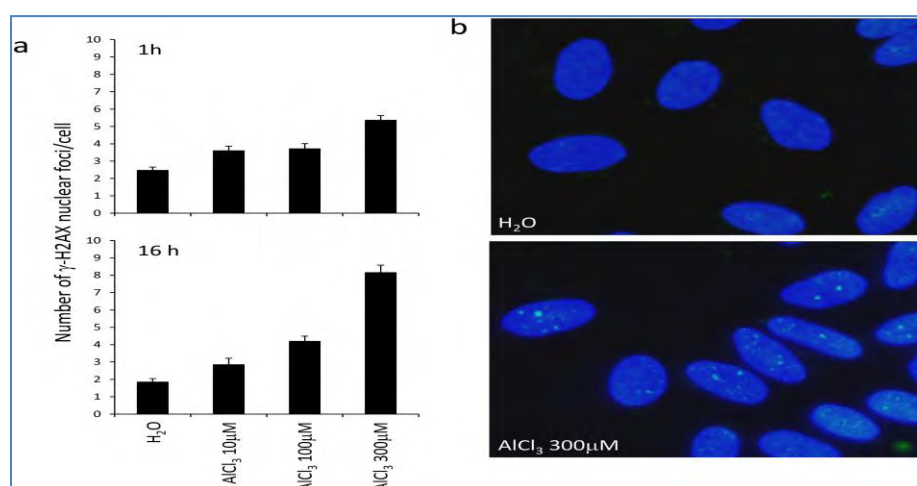
επιδερμίδας αμέσως μετά από το ξύρισμα, η οποία και καθιστά τη δερμίδα εντελώς εκτεθειμένη στο ACH (Darbre, 2006).

*η ικανότητα του δέρματος να απορροφά ACH, ελέγχθηκε με τοπική εφαρμογή αποσμητικών που έχουν ως βάση το ACH σε ανέπαφο δέρμα ποντικών και σε ανέπαφο δέρμα ανθρώπου στην περιοχή της μασχάλης (Darbre, 2006).

1.4.5 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ACH

Το ACH, λόγω του τρόπου και του ιστού που εφαρμόζεται αρχικά έχει κατηγορηθεί για την εμπλοκή του στην καρκινογένεση και συγκεκριμένα, για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Εκτός αυτού βέβαια, φαινόμενα γενotoξικότητας έχουν εντοπιστεί σε διάφορα συστήματα. Ένα από αυτά αποτελεί και το νευρικό σύστημα. Παρόλαυτα, οι περισσότερες μελέτες τοξικότητας έχουν γίνει σε καρκινικές σειρές μαστικών κυττάρων (MCF-7, MCF-10A), στα οποία και εντοπίστηκε η παρεμβολή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση. Το ACH προσδένεται στο σημείο πρόσδεσης της E2 και προωθεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω των ERE στοιχείων (Sappino et al. 2012, Darbre, 2006).

Αν και η μοριακή βάση του φαινομένου δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένη, κάποιες από τις υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί, υποστηρίζουν : 1) πως υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του DNA με το αργίλιο, 2) την επαγωγή βλάβης στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες, 3) ότι υπάρχει επέμβαση στο γενετικό υλικό μέσω της απελευθέρωσης DNA από τα λυσοσώματα, 4) ότι μπορεί να πραγματοποιείται αποσιώπηση της φυσιολογικής λειτουργίας των μικροσωληνίσκων ή 5) ότι επιστρατεύονται οι κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA. (Sappino et al. 2012) Στην παρακάτω εικόνα δίνεται ένα παράδειγμα τοξικότητας του ACH σε MCF-10A κύτταρα.



Εικόνα 7: Το AlCl₃ αυξάνει τα διπλά κατάγματα στο DNA (DSBs) των MCF-10A κυττάρων. (α)αριθμός των γ-H2AX πυρηνικών εστίες ανά κύτταρο, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία 300μM AlCl₃ ή του αντίστοιχου όγκου H₂O και για το χρόνο που αναγράφεται. Οι σταθερές έχουν επαναληφθεί σε τρία διαφορετικά πειράματα. Για την 1^η και τη 16^η ώρα ισχύει P<0.002 (το AlCl₃ σε σχέση με το H₂O. (b)

εικόνα από IHC των γ-H2AX μετά από επώαση με το $AlCl_3$ και το H_2O για 16 ώρες (Sappino et al. 2012).

1.5 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ

Στο αίμα, η μεγαλύτερη ποσότητα του Al, συνδέεται με την τρανσφερίνη, έχοντας μάλιστα την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μέσω ενδοκύττωσης με τη διαμεσολάβηση του υποδοχέα της τρανσφερίνης (Bondy, 2013). Η είσοδός του δια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στον εγκέφαλο, σηματοδοτεί και την αρχή της τοξικής του δράσης στο ΚΝΣ και τη συμμετοχή του στην παθογένεση των νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

Αναφορικά μάλιστα με τη συγκέντρωση του Al στον εγκέφαλο έχει καταγραφεί πως υπάρχει αυξανόμενη συγκέντρωσή του με την πάροδο των ετών (Vucetic-Arsicet et al. 2013).

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως έγινε και παραπάνω αναφορά, είναι ασθένειες που χαρακτηρίζονται από προοδευτικό εκφυλισμό και συστηματική απώλεια λειτουργικών νευρικών κυττάρων (Sertbas et al. 2014). Ανάλογα με το είδος της ασθένειας εκφυλίζονται σταδιακά διαφορετικές περιοχές τόσο του κεντρικού όσο και του περιφερικού νευρικού συστήματος, οδηγώντας στην διαταραχή και πολλές φορές στη διακοπή της νευρωνικής σηματοδότησης από και προς τα σημεία εκείνα με αποτέλεσμα την εμφάνιση των διάφορων παθολογικών φαινοτύπων και τελικά των συμπτωμάτων της αντίστοιχης νόσου. Το γεγονός που καθιστά όλα τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα ανίατα και κατ' επέκταση τραυματικά για τον ίδιο τον ασθενή και τους οικείους του, είναι η ανικανότητα του ανθρώπινου οργανισμού να αναγεννήσει τους εκφυλισμένους νευρώνες, για αυτό και οποιαδήποτε περαιτέρω βλάβη, ουσιαστικά δυσχεραίνει την ήδη βεβαρημένη κατάσταση (Steward et al. 2013).

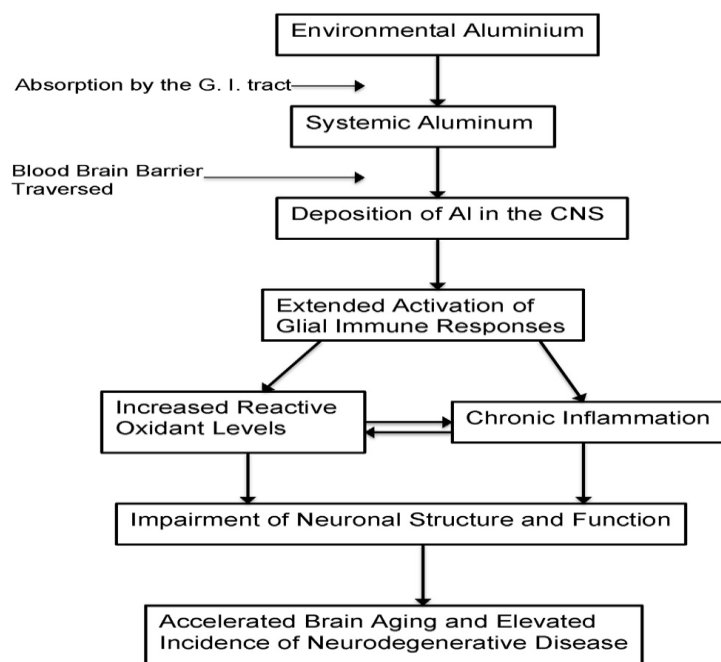
Στο σύνολό τους οι νευρολογικές και νευροψυχιατρικές διαταραχές που σχετίζονται με νευροεκφυλισμό είναι πολλές, οι πιο σημαντικές και συχνά απαντώμενες είναι οι έξης: Parkinson's Disease (PD), Alzheimer's Disease (AD), Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), Συσχετιζόμενη με τη ηλικία Εκφύλιση Ωχρής Κηλίδας (AMD Age-related macular degeneration), Νόσος του Χάντινγκτον (HD Huntingdon's Disease), Σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) και εγκεφαλικά επεισόδια (Steward et al. 2013),.

Σε παραπάνω παράγραφο έγινε αναφορά στα χαρακτηριστικά και στη νευροπαθοθολογία της νόσου Alzheimer και κυρίως για την εμπλοκή που έχουν οι υποδοχείς των οιστρογόνων και τα οιστρογόνα στην πρόοδο αυτής. Σε αυτό το τελευταίο κομμάτι της εισαγωγής, θα γίνει επιγραμματικά λόγος για την δράση που έχει το αργίλιο (μελετήθηκε υπό τη μορφή ACH) αναφορικά με την AD:

1. Αρχικά, έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση αργιλίου σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer (Stephen C. Bondy, 2014).
2. Η είσοδος του αργιλίου στην περιοχή του εγκεφάλου εν μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού έχει φανεί να αυξάνει την καθίζηση του Αβ- αμυλοειδούς, διευκολύνοντας

την δίοδο του, ευνοώντας τελικά το σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών (Grimm et al. 2012).

3. Ακόμη, στους ασθενείς με τη νόσο αυτή, προκειμένου να γίνει όλη αυτή η καταστροφή στους νευρώνες, παρακινούνται μεταξύ άλλων τα μονοπάτια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αύξηση της εγγενούς φλεγμονώδους δραστηριότητας με την αύξηση της ηλικίας του ατόμου. Η παρουσία λοιπόν του αργιλίου συμβάλει στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων της φλεγμονής, με την επαγωγή της δράσης των κυττάρων της μικρογλοίας (Bondy, 2014).
4. Επιπλέον, ένα άλλο μονοπάτι που συμμετέχει σε μοριακό επίπεδο στην αρχή της AD, είναι αυτό των ελευθέρων ριζών. Έχει φανεί δε η εμπλοκή του αργιλίου και στο στάδιο αυτό (Bondy, 2014). Μάλιστα τα δύο αυτά μονοπάτια είναι αλληλένδετα, σκεπτόμενοι τη σχέση οξειδωτικού στρες και φλεγμονώδους αντίδρασης.



Σχήμα 0 : Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων από τα οποία το Al μπορεί να ενισχύσει την πρόοδο της νευρολογικής βλάβης που εξαρτάται από την ηλικία. (Stephen C. Bondy, 2014)

2.ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένης της μεγίστης σημασίας που παίζουν τα οιστρογόνα και η κυτταρική σηματοδότηση μέσω αυτών σε πάμπολλες φυσιολογικές διαδικασίες στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη την καίρια συμμετοχή τους στην παθογένεση και παθοφυσιολογία πλήθους διαταραχών, μία μελέτη που εστιάζει στην οιστρογονική δράση και σηματοδότηση οιστρογονομιμητικών ουσιών αποσκοπεί αρχικά στην κατανόηση της συμμετοχής τέτοιων ουσιών στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Δεδομένου μάλιστα ότι η υπό μελέτη ουσία, τα άλατα του αργιλίου,

έρχονται επί καθημερινής βάσης σε επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, η πιθανή παρεμβολή της σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, θεωρείται υψίστης σημασίας.

Λαμβάνοντας υπό όψιν την πιθανή μεταφορά αλάτων αργιλίου, σε περιπτώσεις τραυματισμών, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της δυνατότητας διέλευσής τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε συνδυασμό με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που ενοχοποιούν το αργίλιο για συμμετοχή του σε νευροεκφυλιστικούς νόσους καθιστά επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης των μηχανισμών δράσης του. Όλα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, πλήττοντας μη αναστρέψιμα εκατομμύρια ανθρώπους ανά την υφήλιο, αποτελούν ένα θέμα συνεχούς έρευνας για την ευρύτερη ιατρική κοινότητα με σκοπό την όσο τον δυνατόν καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην καταστροφή των νευρώνων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη καλύτερης πρόληψης και πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Έχοντας λοιπόν αυτά υπόψη, ο σκοπός της παρούσης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH) σε δύο κυτταρικές σειρές νευρικών κυττάρων (SHSY-5Y και N₂A wt) και η μελέτη της εμπλοκής τους στη ρύθμιση βασικών βιολογικών μορίων, διαδραματίζουν καίριο ρόλο αμυντικούς μηχανισμούς, σε καταστάσεις φλεγμονής και οξειδωτικού στρες.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, η πειραματική προσέγγιση απαρτίζεται από τρία σκέλη.

1. Στο πρώτο σκέλος γίνεται εστίαση στον χαρακτηρισμό των δύο νευρικών κυτταρικών σειρών όσον αφορά την εντόπιση των δύο ισομορφών των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ. Μετά τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών σειρών ως προς την ποιοτική και ποσοτική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, παρουσία E2 και ACH, ακολουθείται η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για τον χειρισμό των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν (SHSY-5Y και N₂A wt), και κυρίως όσον αφορά τις συνθήκες στις οποίες τα κύτταρα καθίστανται δεκτικά στην διαμόλυνση (transfection).
2. Στόχος του δεύτερου μέρους, είναι η μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH. Για την επίτευξη αυτού του στόχου μελετάται τόσο η επίδραση του ACH στην ποιοτική και ποσοτική μεταβολή της κυτταρικής και υποκυτταρικής εντόπισης των ταυτοποιηθέντων ενδογενών ισομορφών ER με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωσης Western.
3. Τέλος το τρίτο μέρος της πειραματικής προσέγγισης αφορά στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών (με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης Western) που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες και τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο οιστρογονικών αποκρίσεων, καθώς και η συγκριτική μελέτη των επιπέδων τους παρουσία E2, ACH, ICI 182,780 και συνδυασμού αυτών.

Εν ολίγοις, το όλο εγχείρημα έχει ως απώτερο σκοπό τη διεξαγωγή κάποιου πιθανού συμπεράσματος: α)για την παρουσία ERs στα νευρικά κύτταρα και για τον αποτελεσματικότερο χειρισμό των εν λόγω καρκινικών σειρών και β) για το ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει το αργιλίο, μέσω της επαγωγήςκαι σηματοδότησης του ER στα γεγονότα του νευροεκφυλισμού.

Τελικώς, δε αποτελώντας παράλληλα κομμάτι μίας μεγαλύτερης μελέτης για την οιστρογονική δράση των αλάτων του αργιλίου (υπό τη μορφή ACH), ευελπιστεί να συμπληρώσει την αχανή εικόνα της συμμετοχής της ουσίας αυτής στην σηματοδότηση δια μέσω ER, με την παροχή κάποιων πληροφοριών, για τη δράση του στα νευρικά κύτταρα.

3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
- Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Μικροσκόπιο φθορισμού: LEICA DM 2000
- Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: OPTIMOS Q IMAGING
- Λουμινόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05™

3.2 ΥΛΙΚΑ

3.2.1 ΧΗΜΙΚΑ

- ACH 50% (Sigma)
- Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)
- APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)

- BSA (Sigma)
- CaCl₂(Merck)
- MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen)
- HOECHST 33342 (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- EDTA (Panreac)
- ECL A +ECL B (Pierce)
- E2(Sigma)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *
- FUGENE (PROMEGA)
- HCl (Merck)
- ICI 182.780 (SIGMA)
- KCl (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen)
- Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen)
- Luciferin buffer(Promega)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaHCO₃ (Merck)
- NaOH (Merck)
- ONPG (Sigma)
- PMSF (SERVA)
- PVA (Sigma)
- SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- TEMED (Research Organics)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)
- Αιθανόλη (Panreac και Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega)

3.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/l Glucose και 1g/l Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
- Opti-MEM® (Life Technologies - Invitrogen)

Περιεκτικότητες των θρεπτικών μέσων:

DMEM 4,5 g/l Glucose & DMEM 1 g/l Glucose: 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

3.2.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **RIPA Buffer:**

Περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA και 0.1 NP-40 σε ddH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **PMSF 200 mM:**

Για την παρασκευή 2 mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200 µL και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):**

Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 µL PMSF 20 mM (20 °C) και 2 µL DTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

- **Διάλυμα Bradford:**

Stock 5x. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

- **HBS 2X:**

Αποτελείται από Hepes 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, NaCl 280 mM. Αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα για παροδική διαμόλυνση με CaCl₂. Ρυθμίζουμε το pH του στο 7,1 με τη χρήση NaOH ή HCl και φιλτράρεται με 0,22mm Filter.

- **Sample Buffer 4x:**

Αποτελείται από 1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20 °C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

- **Tris 20 mM pH 7.5:**

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erppendorf (1.5 mL) αναμειγνύονται 20 µL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980 µL ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **TEMED:**

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **APS 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1 mL ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 10x:**

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται σε όγκο 1 L ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. (Ornstein, 1964; Davis, 1964).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 1×:**

Για την παρασκευή του R.B. 1× αραιώνονται 100 mL R.B. 10× σε 900 mL dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. (Laemmli, 1970). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:**

Αποτελείται από 10 % Running Buffer 10×, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:**

Αποτελείται από 91 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ και 1500 mM NaCl. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:**

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):**

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH₂PO₄ 0.2 M και διβασικού Na₂HPO₄ 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H₂O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O.

3.2.4 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ:

- Αντίσωμα έναντι ERα από κόνικλο, ERα G20 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβ H150 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι β-ακτίνης από επίμυ (Sigma)
- Αντίσωμα έναντι καταλάσης από αίγα (RnD Systems)
- Αντίσωμα έναντι Cu/Zn SOD από αίγα (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι Mn SOD από αίγα (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι NFκB από κόνικλο (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι Casp 3 από κόνικλο (Abcam)
- Αντίσωμα έναντι Bcl 2 από επίμυ (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ (IHC) MCA, (Serotec)
- Αντίσωμα έναντι ERα (IHC) MC20 (Santa Cruz)

3.2.5 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ:

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Jackson Laboratories)
- Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce Antibodies).
- Αντίσωμα έναντι goat IgG-HRP (Pierce Antibodies)
- Αντίσωμα για IHC a-R Alexa 488 (Santa Cruz)

3.2.6 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
- Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcon) (15 mL, 50 mL)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
- Ρύγχοι (0.2-10 µL, 20-200 µL και 100-1000 µL)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× και 24× wells
- Καλυπτρίδες coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου
- Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων, Neubauer
- Αυτόματος πιπεταδόρος

3.2.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο δυο τύπου καρκινικές κυτταρικές σειρές, νευρικού ιστού. Αυτές ήταν οι:

1) N₂A wt

Πληροφορίες από ATCC:

Organism: *Mus musculus*, mouse

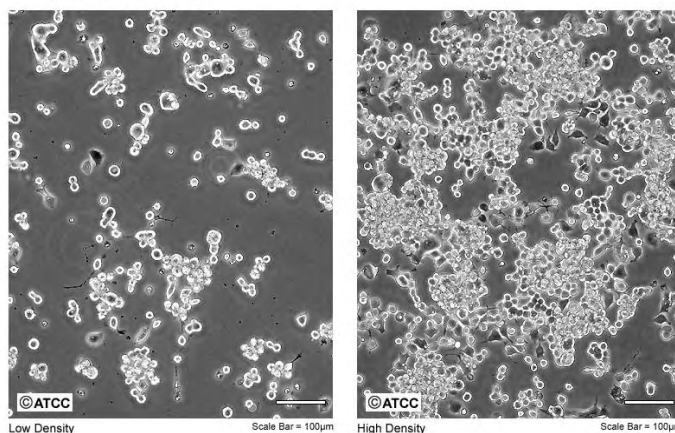
Cell Type: Neuroblast

Tissue: Brain

Disease: Neuroblastoma

Product Format: frozen

ATCC Number: **CCL-131**
Designation: **Neuro-2a**



Εικόνα 8: Παρουσίαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (N₂A wt) από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)

2) SH-SY5Y

Πληροφορίες από ATCC:

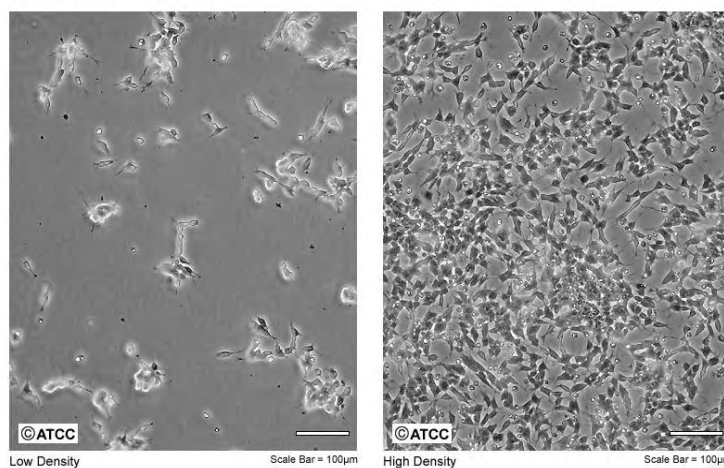
Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: Bone Marrow

Disease: Neuroblastoma

Product Format: frozen

ATCC Number: **CRL-2266**
Designation: **SH-SY5Y**

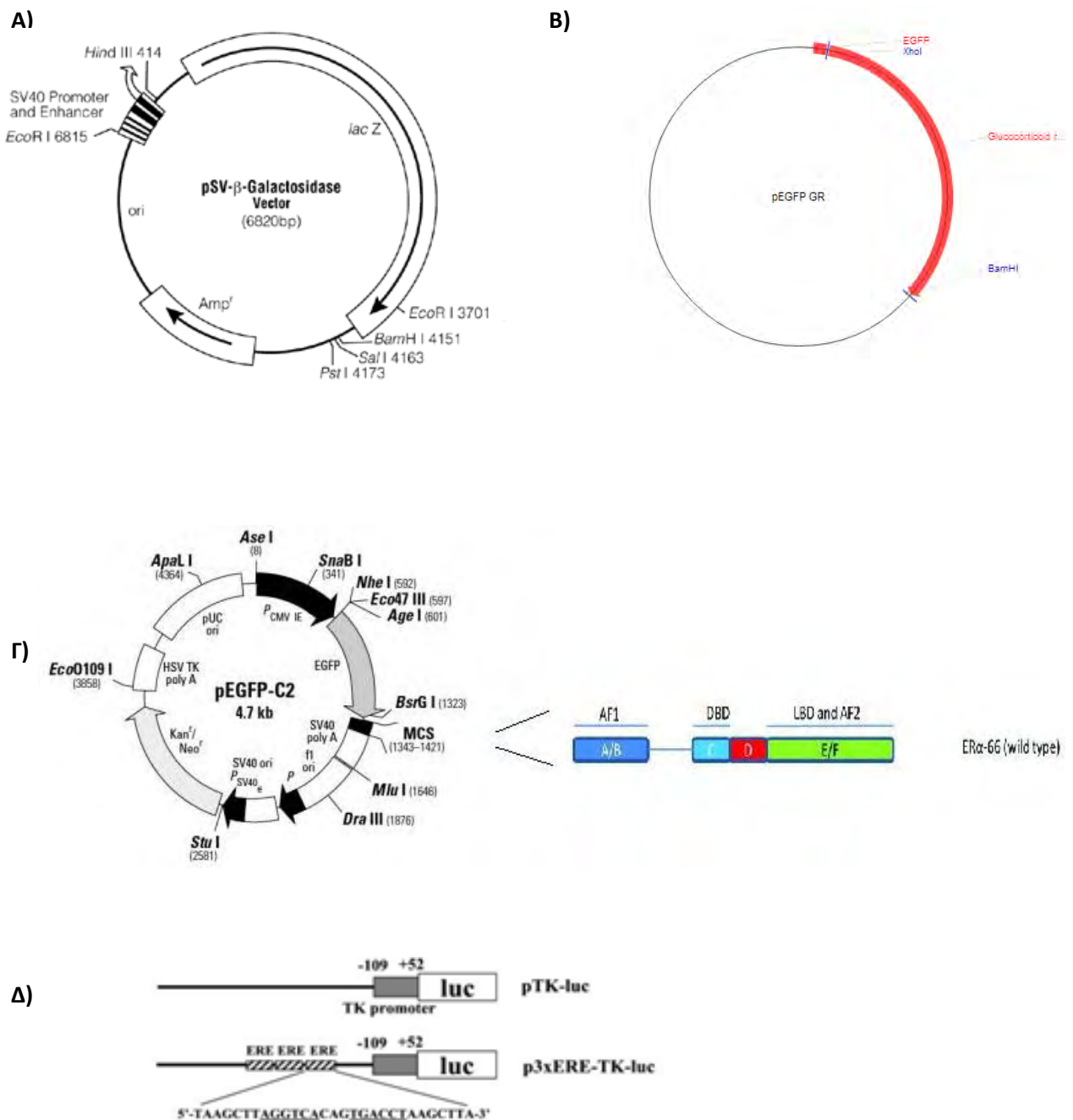


Εικόνα 9: Παρουσίαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (SH-SY5Y) από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)

Επιπλέον, σε κάποιες από τις διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν και κυτταρικά εκχυλίσματα καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστικών κυττάρων (MCF7 και MDA-MB-231), τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς, για παρουσία κι απουσία αντίστοιχα, των ERα υποδοχέων και αποτελούν κομμάτι δουλειάς της διδακτορικής διατριβής του κ. Γοργογιέτα Βύρωνα.

3.2.8 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις διαδικασίες της παροδικής διαμόλυνσης είναι οι ακόλουθοι:



A) πλασμίδιο β-γαλακτοσιδάσης B) pEGFP-GR Γ) pEGFP- C2- ER alpha Δ) TK-ERE-Luc

3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.3.0Α ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Προκειμένου να παραληφθούν προς χρήση οι πλασμιδιακοί φορείς τους οποίους χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων, έλαβε χώρα η διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών εντεροβακτηρίων, *E. Coli*, στελέχους DH5a, τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε 30-40 % γλυκερόλη στους -80 °C, με τη μέθοδο θερμικού σοκ (heat-shock).

Σε πλαστικό σωληνάριο errendorf (1.5 mL) που περιέχει 80 μ L *E. coli* DH5a προστέθηκε 1 μ L του επιθυμητού πλασμιδίου (stock, -20 °C), δουλεύοντας στον πάγο και αφέθηκε προς επώαση στους 4 °C για ≥ 30 min. Ακολούθως, το errendorf μεταφέρθηκε για 1 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42 °C. Έπειτα τοποθετήθηκε στους 4 °C για 2 min και ακλούθησε η προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου LB. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 37 °C για 1 h και κατόπιν έγινε επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τριβλίο με LB-άγαρ το οποίο ήταν επιστρωμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη (amp) ή καναμυκίνη (kan), σε συγκέντρωση 100 μ g/mL ή 50 μ g/mL, αντίστοιχα. Υπό στείρες συνθήκες εφαρμόστηκε η μέθοδος της διασποράς με γυάλινο διανομέα και η επώαση των βακτηριακών κυττάρων γίνεται στους 37 °C για ~16 h.

3.3.0Β ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ pDNA ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΕΣΑΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ (MIDI PREP)

Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου επώασης, λαμβάνει χώρα ο καθαρισμός και τελικός η απομόνωση των πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN χρησιμοποιώντας το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλών αντιγράφων (QIAGEN®, 2012).

Απομονώθηκαν τα πλασμίδια: pSV40-βGal και pTK-ERE-Luc για την κλωνοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* στελέχους DH5a, όπως προαναφέρθηκε στην παραπάνω παράγραφο. Τα stock διαλύματα πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους και ποσοτικοποιήθηκε η περιεκτικότητά τους σε pDNA με φασματοφωτομέτρηση (UV/Vis) σε αρραίωση 1:200. Αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

3.3.1.1 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές που διαθέτουμε φυλάσσονται σε βαθειά κατάψυξη: είτε σε θερμοκρασία -80°C ή σε υγρό άζωτο, -120° C. Η διαδικασία του ξεπαγώματος είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης.

Αρχικά πρέπει να προετοιμαστούν τα πάντα προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το vial να τοποθετηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό και να έρθουν κατά το δυνατόν σε λιγότερη επαφή με το DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους.

Έχοντας ξεπαγώσει, βγάλει, και τοποθετήσει με λασκαρισμένα τα καπάκια, στο hood, όλα τα θρεπτικά, τοποθετούμε 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM 4,5 g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon των 15 ml. Επιπλέον, βγάζουμε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι και τοποθετούμε κάθετα στο hood. Κατόπιν, εξάγεται το cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται εντός του υδατόλουτρου. Δεν αφήνουμε το cryovial, αλλά το κρατάμε, προσέχοντας το νερό να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι αλλά ταυτόχρονα να καλύπτει τον μεγαλύτερο όγκο του παγωμένου περιεχομένου.

Μετά την πάροδο μερικών λεπτών (συνήθως 3-4 min) το περιεχόμενο του cryovial υγροποιείται και φαίνεται εντός του μία μικρή ποσότητα πάγου. Στη φάση αυτή, το βγάζουμε γρήγορα από τα υδατόλουτρο, σκουπίζουμε και ψεκάζουμε με αιθανόλη 70%. Αμέσως, το τοποθετούμε στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood). Εκεί, τοποθετούμε άμεσα το vial σε στατώ και ανοίγουμε γρήγορα και κάθετα το καπάκι του, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή η αιθανόλη με τα κύτταρα. Κατόπιν με σιφώνιο των 2 ml παίρνουμε το περιεχόμενο και το τοποθετούμε στον δοκιμαστικό σωλήνα με τα 4 ml θρεπτικού.

Το 15άρι falcon με το θρεπτικό και τα κύτταρα φυγοκεντρείται για 5 min σε 1000 rpm και σε θερμοκρασία άνω των 20°C (20-25°C). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αναρροφάται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κατόπιν το ίζημα επαναδιαλύεται καλά, σε 5 ml θρεπτικού μέσου, DMEM 1 g/mol Glucose (low Glucose) -για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Τέλος, το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με 5άρα ή 10άρα πιπέτα και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, γίνεται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και κλείνοντας τη φλάσκα, βγάζουμε οριζόντια από το hood, την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο και εξετάζουμε τη μορφή των ξεπαγωμένων κυττάρων. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, στρογγυλά, μαύρα και χωρίς συσσωματώματα.

Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5.0 % CO₂.

3.3.1.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά σπάζοντας τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και τις διάφορες προσκολλήσεις που κάνουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (πλήρους κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα passage.

Ξεπαγώνει η θρυψίνη και τα θρεπτικά υλικά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C . Αφαιρείται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα και τοποθετείται 1-1,5 ml θρυψίνη. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκουμε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Παρατηρούμε γρήγορα στο μικροσκόπιο. Τοποθετούμε άμεσα τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1- 2 λεπτά. Βγάζουμε αμέσως μετά το πέρας (συνήθως του πρώτου λεπτού), εξετάζουμε στο μικροσκόπιο: ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα – μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα, να επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβαίνει, μπορούμε να ταρακουνήσουμε ελαφρά τη φλάσκα και να ξανά παρατηρήσουμε ή να τοποθετήσουμε για μισό λεπτό και πάλι στον κλίβανο. Προσέχουμε ιδιαίτερα τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση.

Κατόπιν, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και προστίθενται σε αυτή 4 ml θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15ml και φυγοκεντρείται (5min 1000rpm, 20-25 °C).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης.

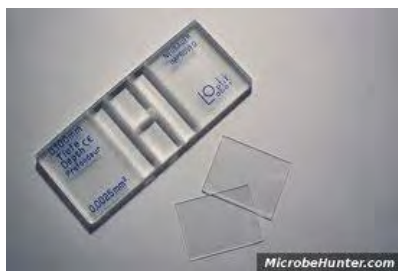
3.3.1.3 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ξεπαγώνουμε τα συστατικά που θα χρειαστούμε και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C. Αυτά είναι, FBS, θρυψίνη και τα θρεπτικά που χρησιμοποιούμε. Ετοιμάζουμε παράλληλα και δύο καινούριους σωλήνες για το πάγωμα των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη- cryovial. Πάνω στα δύο cryovial γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουμε (όνομα, ημ/νια, passage). Συνήθως παγώνουμε δύο- δύο cryovial αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν και πόση ποσότητα ανακαλλιέργεια θα βάλουμε και λοιπά.

Υπολογίζουμε πόσα ml από το FBS χρειαζόμαστε (για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια). Ξεκινάμε και κάνουμε τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, όπως αυτή περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντριση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται στην ποσότητα του βόειου ορού που έχει υπολογιστεί προηγουμένως. Κατόπιν, σε κάθε cryovial τοποθετούνται 0,9 ml FBS με τα κύτταρα. Το υπόλοιπο, επανατοποθετείται στη φλάσκα και συμπληρώνεται (έως τα 5ml) DMEM Low Glucose. Η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Γενικά, προσέχουμε να τακτοποιήσουμε όλες τις «εκκρεμότητες» στο γύρω χώρο πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα του παγώματος.

Μόλις είμαστε έτοιμοι, τοποθετούμε 0,1 ml DMSO (εξαιρετικά κυτταροτοξικό), κλείνουμε άμεσα το cryovial και με συνεχόμενη ανάδευση πάνω- κάτω, τοποθετούμε σε κατάψυξη, κατά το γρηγορότερο δυνατόν. Τέλος, σημειώνεται σε κατάλληλο αρχείο, η θέση του/ των cryovial.

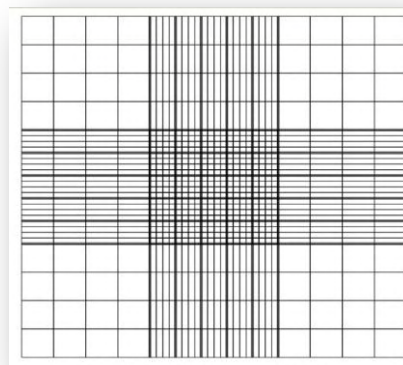
3.3.1.4 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× και 24× wells), για να προστεθούν ουσίες και κατόπιν συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος να μετρηθεί με ανοσολογικές μεθόδους η κυτταρική απόκριση, για προετοιμασία παροδικής ή μόνιμης διαμόλυνσης (transfection), για μετέπειτα εξέταση με

ανασοϊστοχημικές τεχνικές (IHC) και λοιπά, απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του σε well plate.

Κατά τη διαδικασία λοιπόν του μετρήματος του κυτταρικού πληθυσμού, ξεκινάμε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Μετά την επαναδιαλυτοποίηση (που στην περίπτωση της μέτρησης πρέπει να είναι κατά το δυνατόν τέλεια), παίρνουμε 10μL (με κατάλληλη πιπέτα) από τα κύτταρα και τα εισάγουμε εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (φαίνεται στην εικόνα αριστερά).



Κατόπιν τοποθετούμε την πλάκα Neubauer στο μικροσκόπιο. Εκεί, εστιάζουμε στα τεταρτημόρια και ξεκινάμε να μετράμε για κάθε ένα τα κύτταρα που βρίσκονται εκεί.

Όπως, φαίνεται και στην εικόνα δεξιά, αρχικά εστιάζουμε στο σταυρό και κατόπιν από το κέντρο του μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα τεταρτημόρια (αλλά και να προσανατολιστούμε). Συνήθως το 1^ο πάνω αριστερά τεταρτημόριο, ονομάζεται Α, το αμέσως διπλανό του Β, κάτω από το Β είναι το Γ και αριστερά του Γ (δηλ. κάτω από το Α) είναι το Δ. έτσι, η μέτρηση γίνεται από το Α→Δ. Για κάθε τεταρτημόριο, σημειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε. Κατόπιν, βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων ανά τεταρτημόριο: $\mu.o. = (A+B+\Gamma+\Delta)/4$ και αυτός έπειτα πολλαπλασιάζεται με 10.000. Έτσι, ξέρουμε κατά προσέγγιση τον κυτταρικό πληθυσμό που διαθέτουμε, ανά ml.

Έπειτα, για να υπολογιστούν τα ml (από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρωσης)- και έχοντας ήδη υπολογίσει ανάλογα με το τι θα κάνουμε μετά, το συνολικό πληθυσμό που χρειαζόμαστε, κάνουμε το εξής:

«διαιρούμε→ (κύτταρα που θέλουμε) / (κύτταρα που έχουμε)»

Η διαίρεση αυτή μας δίνει τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, προκειμένου να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία η οποία επιτελείται. Επειδή, συνήθως έχει περάσει αρκετή ώρα από την πρώτη επαναδιαλυτοποίηση, αυτή γίνεται εκ νέου, ώστε ο κυτταρικός πληθυσμός να είναι ομοιογενής στο θρεπτικό.

Ο όγκος που λαμβάνεται, τοποθετείται σε νέο falcon, προκειμένου να φυγοκεντρηθεί (όμοια, 5 λεπτά 1000rpm 20-25°C) εκ νέου -μόνο ο κυτταρικός πληθυσμός που θα χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία, τα υπόλοιπα κύτταρα συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια.

Ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που επιτελείται, μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, επαναδιαλυτοποιούμε στην υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού και μοιράζουμε στα wells που θα χρειαστούμε.

Στην περίπτωση δε, που απαιτείται η μελέτη του αποτελέσματος της κυτταρικής αποκρίσεως με ανοσοϊστοχημεία, έχει προηγηθεί το στρώσιμο καλυπτρίδων (coverslips) εντός των wells στο plate. Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων, που γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, το plate παραμένει στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής, ανοιχτό και υπό τη δράση του UV light, για τουλάχιστον μισή ώρα, προκειμένου να είναι πλήρως αποστειρωμένο. Η πλάκα που φέρει καλυπτρίδες, κατά τη διαδικασία του στρωσίματος αντιμετωπίζεται όμοια με αυτή που δε φέρει.

Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων εντός των πηγαδιών, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή, να μην γίνεται έντονη ανακίνηση, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο, γεγονός άκρως ανεπιθύμητο! Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.

3.3.1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (TRANSFECTION)

Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας, είναι η επιτυχής πρόσληψη ενός πλασμιδιακού φορέα και κατόπιν, η επιτυχής έκφραση του γονιδίου που φέρει ο φορέας αυτός, από τον κυτταρικό ξενιστή. Αυτό, μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, η βασική αρχή όμως είναι μία: απαιτείται η ύπαρξη μίας ουσίας ή ενός μηχανισμού που να καταστήσει την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου διαπερατή (είτε ανοίγοντας μικροσπές είτε μέσω μικρών κυστιδίων και τη διαδικασία της ενδοκύτωσης κτλ), στο πλασμιδιακό DNA. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα (γεγονός σχετικά δύσκολο), τα καθιστά εν δυνάμει ικανά να εκφράσουν το γονίδιο που αυτό φέρει.

Επειδή, μέρος της παρούσης εργασίας αφορά την επίτευξη των συνθηκών που καθιστά τα νευρικά κύτταρα ικανά/ δεκτικά να υπόκεινται σε διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς, δοκιμάστηκαν τρεις κύριοι διαφορετικοί τρόποι παροδικής διαμόλυνσης καθώς και με βάση αυτούς, διαφορετικοί πρακτικοί χειρισμοί (λ.χ στην προσθήκη των συστατικών, την ανάδευση και λοιπά)

A) Διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης με τη χρήση kit Eugene.*

Αρχικά, πριν την χρήση του, το αντιδραστήριο πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μισή ώρα. Τα κύτταρα έχουν ήδη ως θρεπτικό υλικό Optimem, προκειμένου να προετοιμαστούν καταλλήλως για τη διαμόλυνση.

Κατά τη χρήση του συγκεκριμένου kit, χρειάζεται η παρασκευή ενός μίγματος. Το μίγμα αυτό περιέχει:

25 μ L Optimem + 500ng pDNA (υπολογισμός μ L αναλόγως των ng του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά) + μ L του αντιδραστηρίου Eugene, ανάλογα με το λόγο pDNA/Eugene, που θα χρησιμοποιηθεί. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιήθηκε η αναλογία DNA/Eugene : $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$

Το μίγμα, ομογενοποιείται και παραμένει για 0-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, με τη μύτη της πιπέτα εντός του θρεπτικού των κυττάρων, εναποτίθεται σε αυτά. Απαιτείται η παραμονή του 24-48 ώρες.

Μετά το πέρα της επαφής του αντιδραστηρίου με τα κύτταρα, γίνεται είτε harvesting ή αν πρόκειται για μετέπειτα ανοσοϊστοχημική εξέταση, μονιμοποίηση.

*οι αναλογίες που αναφέρονται παρακάτω αφορούν την ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται για να γίνει παροδική διαμόλυνση σε 1 πηγαδάκι.

Β) Διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης με τη χρήση Lipofectamine 2000 *

Κατά τη διαδικασία αυτή παρασκευάζονται δύο μίγματα. Στο πρώτο μίγμα προστίθενται: το πλασμιδιακό DNA (στην επιθυμητή ως προς τη lipofectamine αναλογία) μαζί με 25 μ L Optimem, ενώ στο δεύτερο μίγμα προστίθεται η lipofectamine μαζί με 25 μ L Optimem. Στα πειράματα που έλαβαν χώρα, η συνήθης αναλογία DNA/lipofectamine ήταν $\frac{1}{2}$ (χρησιμοποιήθηκαν ακόμη, 1X, 2X).

Τα δύο μίγματα παραμένουν ως έχουν για 5-10 λεπτά, εφόσον αναμιχθούν καλά. Κατόπιν, συντήκονται μεταξύ τους, αναδεύονται και τοποθετούνται για επώαση στο σκοτάδι για διάστημα μισής ώρας.

Μετά την πάροδο του καθορισμένου χρόνου επώασης, το μίγμα βγαίνει από το σκοτάδι και προστίθεται στο πηγαδάκι. Επειδή, η lipofectamine είναι τοξική για τα κύτταρα, απαιτείται η παύση επαφής της με τα κύτταρα, μετά από τέσσερις ώρες, όπου και αφαιρείται το Optimem και στη θέση του τοποθετείται το κλασικό θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς (DMEM Low Glucose).

*οι αναλογίες που αναφέρονται παρακάτω αφορούν την ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται για να γίνει παροδική διαμόλυνση σε 1 πηγαδάκι.

Γ) Διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης με τη χρήση CaCl₂

Αυτός ο τρόπος επίτευξης παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων είναι αρκετά παλιός, πλην όμως αποτελεσματικός. Ουσιαστικά, γίνεται προσπάθεια μέσω της επαφής των κυττάρων με το άλας, να εισάγουν τον πλασμιδιακό φορέα. Κατά την εκπόνηση της παρούσης διπλωματικής εργασίας έγινε πειραματισμός σε ένα αρκετά ευρύ σύνολο χειρισμών και διαφορετικών αναλογιών προκειμένου να εντοπισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

Πρακτικά δοκιμάστηκαν αναλογίες (CaCl₂ / DNA): 3X, 5X, 10X

Τουλάχιστον μία ώρα πριν από την αρχή των διαδικασιών απαιτείται η αντικατάσταση του παλιού θρεπτικού μέσου με νέο, προκειμένου να είναι κατά το δυνατόν καλύτερο και κατ' επέκταση να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες διαμόλυνσης.

Η συνήθης, λοιπόν, διαδικασία απαιτεί τη δημιουργία δύο μιγμάτων. Στο πρώτο μίγμα εισάγεται το HBS 2x και στο δεύτερο μίγμα εισάγεται ddH₂O, pDNA και CaCl₂, (ανάλογα με την επιθυμητή αναλογία). Κατά την προσθήκη των συστατικών του δεύτερου μίγματος, είναι εξαιρετικά σπουδαίο να γίνεται πολύ καλή ανάδευση για μην κατακρημνιστεί το άλας, γεγονός που θα επηρεάσει κατά πολύ την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Μόλις ετοιμαστούν τα δύο αυτά μίγματα, παραμένουν σε ηρεμία για 10 λεπτά και κατόπιν το δεύτερο μίγμα προστίθεται στο πρώτο. Η προσθήκη αυτή, πρέπει να γίνει όσο γίνεται σε περισσότερα στάδια (ουσιαστικά γίνεται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση και των δύο μιγμάτων). Μετά την ομογενοποίησή του, το νέο μίγμα, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου, για μισή ώρα.

Μόλις επέλθει το μισάωρο, προστίθεται το μίγμα στο πηγαδάκι- και πάλιν στάγδην με συνεχή κυκλική ανακίνηση του plate.

Επειδή, πρακτικά δεν είναι δυνατή η στάγδην προσθήκη υπό αέρινη ανάδευση, δοκιμάστηκαν επιπλέον χειρισμοί βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της τεχνικής. Αναφορικά με τους χειρισμούς αυτούς, έλαβαν χώρα τα εξής:

- Αντί για κλασικό θρεπτικό μέσο προστέθηκε optimum και κατόπιν το ολικό μίγμα εισήχθη στο πηγαδάκι κατά 1μL x30 φορές
- Χρησιμοποιήθηκε κανονικά Dmem low Glucose και κατόπιν το ολικό μίγμα εισήχθη στο πηγαδάκι κατά 1μL x30 φορές
- Το θρεπτικό από το πηγαδάκι αναρροφήθηκε, ενώθηκε και ομογενοποιήθηκε με το ολικό μίγμα της αντίδρασης. Έπειτα από καλή ανάδευση τοποθετήθηκε εκ νέου στα κύτταρα
- Τυπικός τρόπος

3.3.1.6 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η προσθήκη ουσιών, είναι ένας από τους λόγους που επιλέγεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε πλάκες με (πηγαδάκια well plates). Ουσιαστικά, σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται μία διαφορετική χημική ουσία (συνήθως οι υπό μελέτη ουσίες), ενώ σε κάποιο από τα wells δεν τοποθετείται ουσία (control) και σε κάποιο άλλο τοποθετείται η φυσική ουσία (ως θετικός μάρτυρας). Κατόπιν, εφόσον τα κύτταρα επωάζονται με τις ουσίες για συγκεκριμένο χρόνο, αυτές αφαιρούνται και γίνεται λύση και συλλογή τους με απώτερο σκοπό την περαιτέρω μελέτη (συνέχεια εργασίας εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών). Η τελευταία διαδικασία είναι αποκαλείται harvesting.

Κατά την παρούσα εργασία η ουσία η οποία μελετήθηκε ήταν το άλας του αργιλίου, συγκεκριμένα ACH, το οποίο έχει φανεί να έχει οιστρογονική δράση. Έτσι, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η E2 (17β-οιστραδιόλη) και ως αρνητικός μάρτυρας το ICI

182,780 (7α,17β-(9-((4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) το οποίο και δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα για την προσθήκη των συγκεκριμένων ουσιών, σε 6x well plate (2ml / well)+1 well από άλλο well plate :

Πρώτα γίνεται παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων από τα stock που διατίθενται.

Για το ACH, υπάρχει σε αρχικό stock 7,5 M και προστίθεται στα κύτταρα σε συγκέντρωση 0,01M προκειμένου να αραιωθεί και να έχει τελικώς συγκέντρωση ίση με 0,0001 M. Άρα, σε 990 μl ddH₂O προστίθενται 150 μl ACH και αναδεύονται καλά. Η τωρινή συγκέντρωση ισούται με 1 M. Από το ACH (1M) αραιώνονται 100 μl σε 900 μl δις απεσταγμένου ύδατος. Η τελική συγκέντρωση τώρα είναι 0,1 M.

Η E2 βρίσκεται σε απόθεμα σε συγκέντρωση 10⁻⁶, αν όχι χρησιμοποιώντας τον νόμο της αραιώσης, μπορεί να προκύψει η ζητούμενη συγκέντρωση. Η οιστραδιόλη, έχει ως διαλύτη την αιθανόλη.

Το ICI είναι σε απόθεμα 0,001M και τοποθετείται σε συγκέντρωση 10⁻⁴M. Διαλύτης του είναι το DMSO.

Επομένως:

Well No1: Control, 2ml DMEM cis +2μl EtOH+ 2 μl ddH₂O +2 μl DMSO

Well No2: E2, 2ml DMEM cis +2 μl E2(10⁻⁶M)+ 2 μl ddH₂O+2 μl DMSO

Well No3: ACH, 2ml DMEM cis +2 μl EtOH+ 2μl ACH (10⁻¹ M) +2 μl DMSO

Well No4: E2+ACH, 2ml DMEM cis +2 μl E2(10⁻⁶M)+ 2 μl ACH (10⁻¹ M) +2 μl DMSO

Well No5:ICI, 2ml DMEM cis +2 μl EtOH +2 μl ddH₂O +2 μl ICI 10⁻⁴M

Well No6: E2+ICI, 2ml DMEM cis +2 μl E2(10⁻⁶M) +2 μl ddH₂O +2 μl ICI 10⁻⁴M

Well No7: ACH+ICI,2ml DMEM cis +2 μl EtOH+2 μl ACH 0,1M +2 μl ICI 10⁻⁴M

Μετά την τοποθέτησή τους, τα well plates τοποθετούνται εκ νέου στον επωαστικό κλίβανο και παραμένουν εκεί για 2-3 ή 4-5 μέρες.

Μετά το πέρας των δεδομένων ημερών γίνεται απόξεση (Harvesting) και λύση των κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία της απόξεσης από το πηγαδάκι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, γίνεται μία πλύση με PBS 1X, άμεσα και κατόπιν τοποθετείται το Lysis Buffer 1X, (εάν απαιτείται γίνεται προηγουμένως αραιώση) 70μl/well. Ολόκληρη η πλάκα εξάγεται από τον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών και τοποθετείται για μισή ώρα σε ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση. Μόλις, επέλθει το μισάωρο- εφόσον έχουν ετοιμαστεί άδεια erpendorfs (ένα για το κάθε πηγαδάκι), το περιεχόμενο των wells αποξάινεται με ειδικό εργαλείο ή με το τιπ της πιπέτας. Το LB συλλέγεται με τα κύτταρα στα erpendorfs. Μετά από αυτό μπορεί να γίνει αμέσως

φυγοκέντρηση (15.000 rpm, 5min, 4 °C) και κατόπιν λύση με υπερήχους και μέτρηση συνολικής πρωτεΐνης, με τη μέθοδο Bradford, ή να φυλαχθούν τα δείγματα σε βαθειά κατάψυξη (-80 °C) και να προχωρήσουμε παρακάτω σε δεύτερο χρόνο.

3.3.1.7 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS

Για την απενεργοποίηση του FBS, δηλαδή την απόρριψη όλων των ενεργών βιολογικών συστατικών του, όπως είναι λ.χ οι ορμόνες, προς παρασκευή cis-FBS εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού (Sigma, n.d.).

Ο ενεργός άνθρακας έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια κι ως εκ τούτου να αφαιρεί ορμόνες (ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδά τους) όπως ανδρογόνα, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, T3 και T4 από το FBS. Οι συγκεκριμένες λιπιδικές ορμόνες του ορού είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασης τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη, η οποία και είναι απαραίτητη για την περαιτέρω μελέτη και την πρόοδο του πειράματος.

3.3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

3.3.2.1Α ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ/Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα έπειτα από τη διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων. Οι πλασμιδιακοί φορείς (στην προκειμένη μελέτη) φέρουν: 1) τη β-γαλακτοσιδάση και 2) το ERE στοιχείο, συνδεδεμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, έτσι ώστε στα κύτταρα που θα προστεθεί οιστραδιόλη, να εκφραστεί το γονίδιο και να καταλυθεί η αντίδραση.

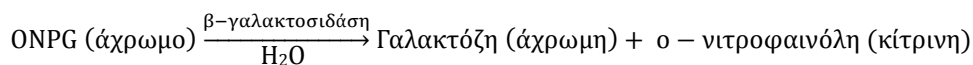
Το πρωτόκολλο αυτό αποτελείται από δύο ξεχωριστές διαδικασίες: αυτή της μέτρησης της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης και αυτή της μέτρησης ενεργότητας της λουσιφεράσης. Η τιμές που λαμβάνονται από τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, είναι εκείνες με τις οποίες πραγματοποιείται η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Α) Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης (b- gal assay):

Επειδή, η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν εξαρτάται από τη μεταγραφική δραστηριότητα του ER (alpha/ beta), μπορεί με αυτόν τον τρόπο να γίνει αντιληπτό πόσο αποτελεσματική ήταν η διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης που έλαβε χώρα και επιπλέον, μπορεί να είναι εφικτή η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από τη ERE- Luc.

Αρχή της μεθόδου:

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Η αντίδραση καταστέλλεται με προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση απενεργοποιείται και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος (Miller, 1972).

Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm.

Πειραματική διαδικασία:

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Bengs και Leonhardt (2000) και έπεται της μεθόδου της διαμολύνσεως κυττάρων. Κατά την πειραματική αυτή διαδικασία, όγκος ίσος με 20 μL κυτταρικού εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα αναμειγνύεται με 0.3 μL διαλύματος ιόντων Mg^{2+} 100 \times και 201 μL διαλύματος sodium phosphate.

Το διάλυμα ιόντων Mg^{2+} αποτελείται από 31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v MgCl_2 και 58.5 % v/v ddH₂O. Τελευταίο και σχεδόν ταυτόχρονα σε όλα, προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, όγκου 66 μL . Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος (30 min είναι ο ιδεατός χρόνος ανάπτυξης της απαιτούμενης έντασης, πολλές φορές όμως, κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης πειραματικής διεργασίας απαιτήθηκε πολύ περισσότερος χρόνος). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μL διαλύματος Na_2CO_3 1 M.

Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης, τα δείγματα φασματοφωτομετρούνται στα 420 nm, αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του μηχανήματος με τον τυφλό σωλήνα. Ο τυφλός σωλήνας περιέχει ό,τι και τα υπόλοιπα διαλύματα με τη διαφορά πως αντί για δείγμα έχουν προστεθεί 20 μL από το χρησιμοποιηθέν Lysis Buffer.

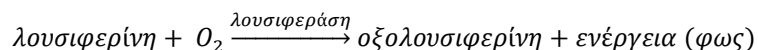
B) Δοκιμασία λουσιφεράσης

Κατά τη δοκιμασία αυτή, είναι ήδη γνωστό ότι η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση υπόκειται στον μεταγραφικό έλεγχο του ER , καθώς βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες ERE αλληλουχίες. Χρησιμοποιείται, έτσι, ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες που αφορούν στη

μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν υποστεί διαμόλυνση (transfection) με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην ανίχνευση του φωτός που παράγεται από την οξειδωση της χρωστικής λουσιφερίνη, σύμφωνα με την αντίδραση χημειοφωταύγειας:



Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε δύο μέρη και καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση (το ένζυμο αυτό έχει εισαχθεί με τον πλασμιδιακό φορέα), παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή τα Ca^{2+} . Η ενεργότητά της προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, LuBat 39508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Η Πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει:

Την προσθήκη όγκου 20 μL από το κυτταρικό εκχύλισμα κάθε δείγματος και την ανάμιξή του με 100 μL διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης είναι φωτοευαίσθητο και συνίσταται από: 470 μM λουσιφερίνη, 530 μM ATP, 270 μM συνενζύμου A, 20 mM Tris pH 8.0, 2.67 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, και dH_2O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου. Το κρίσιμο σημείο αυτής της τεχνικής είναι ο χρόνος έκθεσης του δείγματος στο διάλυμα της λουσιφερίνης. Αυτός πρέπει να είναι αυστηρά ίσος με 5''. Έτσι, απαιτείται πλήρης τήρηση του χρόνου επώασης και μέτρησης, κατανοώντας πως μόνον έτσι τα αποτελέσματα θα είναι αξιόπιστα!

3.3.2.1β ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)

Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά, θέλουμε να επιτύχουμε κατά το δυνατόν μεγαλύτερη λύση των κυττάρων. Συνήθως, επαναλαμβάνουμε 4 κύκλους όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1'' στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με ένα λεπτό.

Εφόσον ολοκληρωθούν οι δεδομένοι κύκλοι, τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Στην προκειμένη περίπτωση, γίνεται μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Bradford. Αυτό αποσκοπεί στον μετέπειτα υπολογισμό της ποσότητας από τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει ηλεκτροφόριση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η μέθοδος Bradford έχει βασική αρχή την αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες, μπορεί από την κόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της, προσδεδεμένη με τις πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στο προς εξέταση διάλυμα. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Από πρακτικής άποψης, ετοιμάζονται τόσο δοκιμαστικοί σωλήνες όσο και τα δείγματα που διαθέτουμε +1 ακόμη, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό, για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Επειδή, το απόθεμα του αντιδραστήριου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι 5X, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραιώσης προκύπτει το επιθυμητό 1X. Από αυτό, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1ml αντιδραστήριου Bradford και κατόπιν σχεδόν παράλληλα σε όλα, 1μL από το κάθε δείγμα. Μετά από άμεσο vortex, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm, μετά από μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό.

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο $y=0,0345x+0,01$, όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

Τα δεδομένα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόριση.

3.3.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προχωρούμε στην παρασκευή τους. Τα δείγματα ηλεκτροφόρισης περιέχουν τα εξής:

- Total cell extract
- Tris HCl pH 7,5
- SB 4X 20μl (σταθερή ποσότητα)

* Οι υπόλοιποι όγκοι καθορίζονται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος, ο δε τελικός όγκος είναι 80μl

Μετά την ετοιμασία τους, τα δείγματα φόρτωσης παραμένουν στον πάγο. Παράλληλα ξεκινάμε την κατασκευή της πηκτής πολύ-ακρυλαμίδης. Πρωτίστως, παρασκευάζεται η γέλη διαχωρισμού (separating gel), η σύσταση της οποίας περιλαμβάνει τα εξής (περιεκτικότητας 12%):

ddH ₂ O	3,25 ml
1,5 M Tris HCl pH= 8,8	2,5 ml
SDS 10%	100μl
Bis Acr. 40%	4 ml
Temed	5 μl
APS 10%	50 μl

Για να ξεκινήσουμε την όλη διαδικασία, πρέπει να έχει ετοιμαστεί και στηθεί η συσκευή κατασκευής του gel. Ουσιαστικά, πρέπει να εφαρμοστούν και να κλείσουν σωστά τα δύο τζάμια, να τοποθετηθούν στη βάση τους και να γίνει έλεγχος για τυχόν διαρροή. Είναι επίσης σημαντικό, κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού να μπουν τα συστατικά με τη σειρά που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Τα δε τελευταία τρία συστατικά, απαιτείται να εισαχθούν κατά το δυνατόν ταυτόχρονα.

Μόλις ετοιμαστεί το gel, αναδεύεται και άμεσα, εγχύεται μεταξύ των δύο τζαμιών. Ταυτόχρονα, στην πάνω περιοχή μένει ένα κενό 2-3 εκατοστών για να τοποθετηθεί σε δεύτερο χρόνο το gel προσκόλλησης. Στο κενό εκείνο τοποθετείται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό, κατά το χρόνο πήξης του υπόλοιπου όγκου του. Ο χρόνος πήξης είναι περίπου μισή ώρα.

ddH ₂ O	2,26 ml
Tris HCl pH= 6,8	1ml
SDS 10%	40 μl
Bis Acr.40%	680 μl
Temed	12 μl
APS 10%	40 μl

Με την πάροδο του χρόνου πήξης, ξεκινάμε τη δημιουργία του gel προσκόλλησης, η σύσταση του οποίου είναι η ακόλουθη:

Κατά την δημιουργία του gel αυτού, πριν εισαχθούν τα τρία τελευταία συστατικά, που είναι άκρως σημαντικό να μπουν σχεδόν ταυτόχρονα και το gel να εισαχθεί στη βάση του, αφαιρείται η ισοπροπανόλη από το πάνω μέρος του διαχωριστικού gel, με απόχυσή της στο πλάι. Κατόπιν, τοποθετούνται τα τρία τελευταία συστατικά, γίνεται γρήγορα ομογενοποίηση και τέλος αποχύνεται το νέο gel στα τζαμάκια στη βάση, προκειμένου να πήξει και παράλληλα να κολλήσει με το gel διαχωρισμού. Αμέσως μόλις αποχυθεί το υγρό gel, εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης. Ο δε χρόνος πήξεως είναι 30 λεπτά της ώρας.

Ενώ αναμένεται η ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, ενεργοποιούμε τη συσκευή Heat Blocker, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 95°C. Παράλληλα, στήνουμε και τη συσκευή ηλεκτροφόρισης, στήνοντας την ειδική κασετίνα και κατόπιν γεμίζοντας εξωτερικά με διάλυμα ηλεκτροφόρισης (δεύτερης χρήσης). Εφόσον, έχει πήξει το gel, τα τζαμάκια εξάγονται από τη βάση τους και τοποθετούνται στην κασετίνα που έχουμε εισάγει στη συσκευή ηλεκτροφόρισης. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι, προκειμένου να ετοιμαστούν τα πηγαδάκια. Μόλις όλα αυτά ετοιμαστούν, γεμίζουμε ως το χείλος, εντός της κασετίνας με φρέσκο διάλυμα ηλεκτροφόρισης.

Σε επόμενο στάδιο, εξάγουμε τα δείγματα από τον πάγο και τα τοποθετούμε στο Heat Blocker (5min ή 3min ανάλογα με το αν έχουν υποστεί ξανά θέρμανση ή όχι).

Τέλος, τα δείγματα υπόκεινται σε ελαφρό spin για χρόνο 3'' και κατόπιν, φορτώνονται στα πηγαδάκια. Ο όγκος φόρτωσης για τα δείγματα είναι συνήθως 20 μl και παράλληλα, σε παρακείμενο πηγαδάκι, φορτώνονται 5 μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους.

Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης των δειγμάτων, τοποθετείται προσεχτικά, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια της συσκευής. Είναι πολύ σημαντικό, τα χρώματα των επαφών και των ηλεκτροδίων να ταυτίζονται. Ενεργοποιείται και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό ρεύματος στα 0,02 mA. Ξεκινάμε την εφαρμογή της τάσης. Το gel αφήνεται να «τρέξει» για όσο χρόνο χρειαστεί.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, απενεργοποιείται το τροφοδοτικό και γίνονται οι προετοιμασίες για να γίνει ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3.3.2.3 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΑΦΟΡΑ

Καθώς ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρισης ξεκινάει το επόμενο στο βήμα, στο οποίο γίνεται η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και του gel, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10 λεπτά. Πρακτικά, σε δοχείο που χωράει τη μεμβράνη, τα χαρτιά whatman και τα σφουγγαράκια, τοποθετείται φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζονται όλα τα παραπάνω μέσα σε αυτό.

Παρομοίως, σε δεύτερο δοχείο, τοποθετείται χρησιμοποιημένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζεται εντός του το gel. Μετά το πέρας του δεκαλέπτου, στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων.

Κατά το στήσιμο αυτής της κασετίνας, εργαζόμαστε ως εξής:

Η κασετίνα τοποθετείται ανοιχτή, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω και την άσπρη προς τα πάνω. Στην κάτω πλευρά, τοποθετείται πρωτίστως, ένα σφουγγαράκι, όχι πολύ στραγγισμένο και έπειτα δύο χαρτιά whatman. Παίρνοντας το δεύτερο χαρτί whatman από το διάλυμα, επιχειρείται η ταυτόχρονη «αλίευση» και της μεμβράνης, η οποία τοποθετείται ακριβώς πάνω από το δεύτερο χαρτί. Κατόπιν το gel τοποθετείται ακριβώς πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προσέχοντας όσο γίνεται να είναι ευθυγραμμισμένο με αυτή αλλά και όλες οι περιοχές που έχουν μπάντες να εφάπτονται στη μεμβράνη. Μετά, τοποθετούνται εκ νέου δύο χαρτιά whatman. Εν ολίγοις, η όλη κατασκευή είναι τύπου sandwich! Σημαντικό είναι, σε κάθε βήμα από την τοποθέτηση της μεμβράνης και έπειτα να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πλήρη εφαρμογή των αντικειμένων μεταξύ τους, διότι η ύπαρξη φυσαλίδων, θα έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη κενών σημείων στη μεμβράνη. Τέλος, τοποθετείται και το δεύτερο σφουγγαράκι, κλείνοντας την κασετίνα και τοποθετώντας τη στη συσκευή που θα γίνει η ηλεκτρομεταφορά.

Η συσκευή αυτή είναι πολύ σημαντικό να είναι βυθισμένη σε πάγο γιατί είναι επικίνδυνο, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης και από

το κύκλωμα που δημιουργείται κατά την ηλεκτρομεταφορά, ενδέχεται να καεί το gel και η μεμβράνη. Έχοντας, λοιπόν, ήδη τοποθετήσει την παγοκύστη εντός της συσκευής, τοποθετούμε την κασετίνα με συγκεκριμένη φορά και κατόπιν γεμίζουμε όλο το δοχείο με φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Τοποθετείται τέλος, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια, προσέχοντας να γίνει στη σωστή πλευρά η εφαρμογή και ενεργοποιείται το τροφοδοτικό. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί τάση ίση με 0.35 A και χρόνο πραγματοποίησης 70 λεπτά.

3.3.2.4 BLOCKING ME ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ME TO ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Μόλις επέλθει ο χρόνος ηλεκτρομεταφοράς, το τροφοδοτικό απενεργοποιείται και η μεμβράνη (που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται εντός PBST 1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους με μολύβι, και να μαρκαριστεί παράλληλα και η «καλή» της πλευρά. Με αυτό τον τρόπο, η μεμβράνη εκτός των άλλων έχει πλυθεί με PBST 1x για μία φορά.

Στη συνέχεια, έπεται το επόμενο βήμα, το οποίο έχει ως σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τα αντισώματα που εμπεριέχονται στο γάλα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης ψευδούς θετικού αποτελέσματος (ή μεγάλου Background), λόγω μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος (που θα εφαρμοστεί). Η διαδικασία αυτή, περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης (μία ώρα υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου), σε γάλα, 10%.

Παρασκευάζεται το διάλυμα του γάλακτος, αραιώνοντας δέκα μέρη σκόνης γάλακτος σε 100 μέρη PBST 1x και αναδεύοντας καλά για να γίνει η ομογενοποίησή του.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας επώασης, γίνεται μία πλύση με PBST 1x και κατόπιν τοποθετείται η μεμβράνη στο πρώτο αντίσωμα. Σε αυτό το βήμα, το αντίσωμα που πρόκειται να επωαστεί η μεμβράνη, έχει ήδη βγει από τους -20°C και έχει τοποθετηθεί σε πάγο, προκειμένου να ξεπαγώσει ομαλά. Ενώ λοιπόν αυτό έχει ξεπαγώσει, αναδεύεται ομαλά για να ομογενοποιηθεί και κατόπιν ετοιμάζεται το σακουλάκι στο οποίο θα εισαχθεί η μεμβράνη για να επωαστεί με το αντίσωμα. Πρακτικά, η μεμβράνη περικλύζεται ορμητικά μεταξύ δύο νάιλον διαφανειών από τρία μέρη και πριν κλείσει και από το τέταρτο μέρος, εισάγεται σε αυτή την αυτοσχέδια σακούλα, το αντίσωμα. Κατόπιν, κλείνεται με θερμοκόλληση και από την τέταρτη πλευρά, τοποθετείται σε μεγάλο τριβλίο και εισάγεται στο coldroom, όπου θα παραμείνει εκεί υπό ανάδευση, για overnight επώαση.

Την επόμενη μέρα, το αντίσωμα μαζεύεται στο σωληνάκι (falcon) στο οποίο βρισκόταν, και η μεμβράνη πλένεται πέντε φορές με PBST 1x, προκειμένου να προετοιμαστεί για την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος. Οι πλύσεις (5 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε R.T και υπό ανάδευση), έχουν ως σκοπό να διώξουν την περίσσεια του αντισώματος και επομένως να μείνει στη μεμβράνη μόνο ό,τι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επίτοπους, για τους οποίους φτιάχτηκε και προστέθηκε το αντίσωμα.

3.3.2.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ -WESTERN BLOT

Το δεύτερο αντίσωμα προστίθεται, όντας ειδικό έναντι κάποιων επιτόπων του πρώτου αντισώματος (συνήθως το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές

επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί). Επιπλέον, είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP), που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Εφόσον, λοιπόν, έχουν λάβει χώρα οι πλύσεις από την επώαση του πρώτου αντισώματος, γίνεται η ίδια διαδικασία για την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος. Ο χρόνος επώασης για το δεύτερο αντίσωμα είναι περίπου μία ώρα.

Ενώ αφαιρείται το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 4X πλύσεις με PBST 1X, διάρκειας 5 min η κάθε μία. Κατόπιν, ετοιμάζεται η κασετίνα προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης Western.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και διαβρέχεται με τα διαλύματα ECL A και ECL B, τα οποία ουσιαστικά είναι αυτά που επιτρέπουν την εμφάνιση του σήματος. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μιας πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέτα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός.

Κατόπιν, έπεται η διαδικασία της εμφάνισης σήματος, η οποία λαμβάνει χώρα στο σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης. Εκεί, ετοιμάζεται κατάλληλα ο χώρος ούτως ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση όλων των κινήσεων σε απόλυτο σκοτάδι.

Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για το χρόνο που απαιτείται. Έπειτα, το film εξάγεται από τη κασετίνα και εμβάπτιζεται διαδοχικά σε διάλυμα developer υπό ανάδευση για περίπου 1 min, ξεπλένεται ελαφρώς σε νερό και αμέσως τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης σήματος fixer (ομοίως υπό ανακίνηση για χρονική διάρκεια περίπου ενός λεπτού). Μετά την ολοκλήρωση της εμβάπτισης του film στο fixer, αυτό ξεπλένεται σε νερό και κατόπιν εξετάζεται το αποτέλεσμα της εμφάνισης. Αναλόγως του αποτελέσματος επαναλαμβάνουμε, εκθέτοντας το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη.

3.3.2.6 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (IHC)

Με την ανοσοϊστοχημική μελέτη, επιτρέπεται ο προσδιορισμός μορίων τοπικά, μέσα στον ιστό ή το κύτταρο που μελετάται με τη χρήση συγκεκριμένων, φθορίζοντων αντισωμάτων, ειδικά για κυτταρικά οργανίδια αλλά και για τα υπό μελέτη μόρια. Η αρχή της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα στην αίθουσα των κυτταροκαλλιιεργειών, όπου πριν από την προσθήκη των κυττάρων στα ειδικά πηγαδάκια, τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Μετά την τοποθέτησή τους, οι καλυπτρίδες αφήνονται για τουλάχιστον μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV. Κατόπιν της αποστείρωσης, όλες οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι όμοιες με εκείνες που αναλύθηκαν παραπάνω, για τη μέτρηση και το στρώσιμο των κυττάρων, την ενδεχόμενη παροδική διαμόλυνση και την προσθήκη ουσιών. Επιπλέον, όλοι οι κυτταρικοί χειρισμοί (αλλαγή θρεπτικού μέσου, φύλαξη, μικροσκοπική παρατήρηση), γίνονται κατά πανομοιότυπο τρόπο, είτε υπάρχουν είτε όχι καλυπτρίδες.

Εφόσον λοιπόν, έχουν γίνει όλοι οι απαραίτητοι πειραματικοί χειρισμοί, προκειμένου να εξεταστούν τα δείγματα ανοσοϊστοχημικά, απαιτείται ο χειρισμός τους με μία

συγκεκριμένη μεθοδολογία, που περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση (fixation), την προσθήκη πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, και εν τέλη την προσκόλλησή των καλυπτρίδων σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες και την εξέταση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Συγκεκριμένα, η παραλλαγή στους χειρισμούς αρχίζει, στο στάδιο της προσθήκης των ουσιών, ενώ το βασικό επερώτημα είναι αν απαιτείται η χρώση και η παρατήρηση των μιτοχονδρίων, ή όχι. Εάν, όντως στη μελέτη πρέπει να συμπεριληφθούν και εικόνες από τα μιτοχόνδρια, τότε στα μίγματα που παρασκευάζονται για τις ουσίες, εισάγεται μαζί και η κόκκινη χρωστική των μιτοχονδρίων, CMXROS. Ο ελάχιστος χρόνος επαφής της χρωστικής με τα ζώντα κύτταρα είναι τριάντα λεπτά.

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες, γι' αυτό και συνήθως εργαζόμαστε εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών. Η διαδικασία, περιλαμβάνει δύο συνεχόμενες πλύσεις με κρύο PBS 1X και κατόπιν την προσθήκη παγωμένης (συνήθως βρίσκεται σε βαθειά κατάψυξη στους

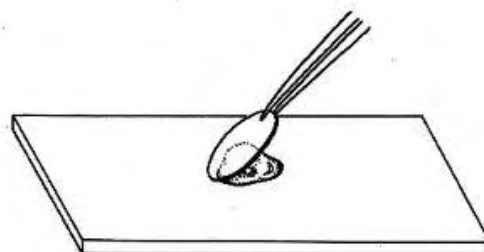
-80°C), τόση όση να καλύπτει όλη την επιφάνεια (περίπου 500 μl). Τα δείγματα, τοποθετούνται στους -20°C, σε ευθεία θέση, για διάστημα 10 min. Κατόπιν, αναρροφάται η μεθανόλη. Εάν στα δείγματα είχε προστεθεί η κόκκινη μιτοχονδριακή χρωστική CMXROS, απαιτείται και άμεση προσθήκη ακετόνης (κατά τον ίδιο τρόπο) και η άφεση τους σε θερμοκρασία -20°C για 3 min.

Εάν, έχει χρησιμοποιηθεί ακετόνη: με την πάροδο των 3 min, αναρροφούμε την ακετόνη και αφήνουμε τις καλυπτρίδες (περι 20 δευτερολέπτων), προκειμένου η περίσσεια της να εξατμιστεί. Λόγο της υψηλής διαβρωτικής δράσης της ακετόνης προσθέτουμε PBS 1X και μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε νέα, μη διαβρωμένα πηγαδάκια, που ήδη περιέχουν PBS 1X.

Εάν δεν έχει τοποθετηθεί ακετόνη, το παραπάνω βήμα παραλείπεται και κατόπιν, πραγματοποιούνται 2X πλύσεις με PBST 1X, και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε μέρος κατάλληλο για την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος.

Γίνεται δε, η παρασκευή του πρωτογενούς αντισώματος, (σε αναλογία 1/50) και μία σταγόνα (25 μl) από το διάλυμα του αντισώματος τοποθετείται επί της καλυπτρίδας, και αφήνεται στο σκοτάδι και σε R.T, να επωαστεί για μία ώρα.

Με τη πάροδο του χρόνου επώασης, έπονται δύο πλύσεις με PBST 1X και κατόπιν η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος.



Το δευτερογενές αντίσωμα, περιλαμβάνει (για τις δικές μας πειραματικές προσεγγίσεις που ως πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο ER β H150), το anti- R-Alexa 488, σε αναλογία 1/500 (σε PBST 1X clear) και 0,25 μl Hoechst (μπλε χρωστική των πυρήνων).

Τοποθετούνται 50 μl σε κάθε καλυπτρίδα και αφήνονται υπό τις ίδιες συνθήκες για μία ώρα επώαση. Τέλος, ακολουθούν δύο εκ νέου πλύσεις με PBST 1X και η κόλληση τους -από την πλευρά που έχουν γίνει οι επώσεις (με την προσθήκη μίας σταγόνας PVA, στην αντικειμενοφόρο πλάκα). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα, όπου αφήνονται στους 4°C, να στεγνώσουν.

Σε δεύτερο χρόνο γίνεται η παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού και η συλλογή εικόνων με τα αποτελέσματα.

4.ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Αρκετά από τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν παρακάτω αλλά κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, απαιτήθηκε υπολογιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, κατά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υπάρχουσας πρωτεΐνης, με τη χρήση της μεθόδου Bradford και έπειτα κατά τον υπολογισμό της σύστασης του δείγματος ηλεκτροφόρισης χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Office Excel. Για την λήψη των εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η ψυχόμενη κάμερα Optimos και το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων, Q-Capture Pro.

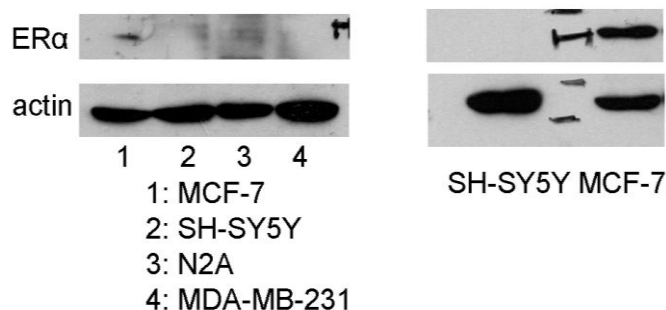
5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ERS ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A ΚΑΙ SH-SY5Y

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ύπαρξης των ενδογενών επιπέδων, των δύο ισομορφών των υποδοχέων των οιστρογόνων, ERα και ERβ. Αυτό το ερώτημα προσεγγίστηκε με δύο τρόπους, α) με ανοσοαποτύπωση Western (western blot) και β)ανοσοϊστοχημικά

5.1.1. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΑΛΦΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERA) ΣΕ N2A ΚΑΙ SHSY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό των δύο κυτταρικών σειρών νευρικών κυττάρων N2A και SH-SY5Y όσο αφορά τόσο την ποιοτική όσο και την ποσοτική εκτίμηση της ύπαρξης της άλφα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων, μελετήθηκε η ύπαρξη του υποδοχέα με ανοσοχημικές μεθόδους και χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα. Ο ακριβής χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών όσο αφορά την εντόπιση των δύο υποδοχέων θα συντελέσει στην καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων όσο αφορά τη μελέτη της οιστρογονικής δράσης του ACH. Όμοια μελέτη εκτελέστηκε παράλληλα σε MCF-7 και MDA-MB-231 τα οποία σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι ERα θετικά και αρνητικά κύτταρα αντίστοιχα.

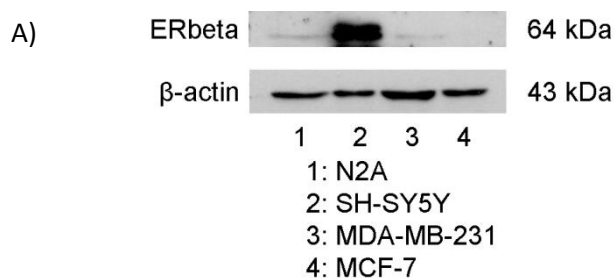


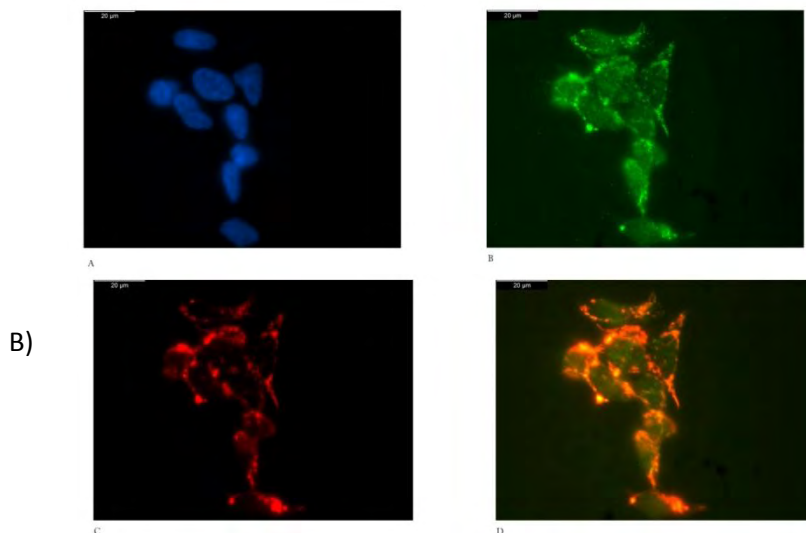
Σχήμα 1. Διερεύνηση της κυτταρικής εντόπισης του ERα σε N2A και SHSY5Y. Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2A, SH-SY5Y, MCF-7 (θετικά ως προς την παρουσία ERα) MDA-MB-231 (αρνητικά ως προς την παρουσία ERα) ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ERα και ακτίνης (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) με χρήση ειδικών αντισωμάτων (ERα-G20, SC; actin).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 1), η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western όσο και ανοσοκυταροχημική μελέτη με χρήση ειδικών αντισωμάτων (δεν παρατίθεται εικόνα για τον ERα, εφόσον δεν ήταν θετικά), αποκαλύπτει την παρουσία ελάχιστων ή καθόλου επιπέδων ERα στις δύο κυτταρικές σειρές των νευρικών κυττάρων που μελετήθηκαν, γεγονός που μαρτυρά την απουσία του (ή τα μειωμένα επίπεδα έκφρασής του) από τις εν λόγω κυτταρικές σειρές. Η αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων αποδεικνύεται από την παρουσία πρωτεϊνικής ζώνης στα MCF-7 κύτταρα, που σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι θετικά ως προς την ύπαρξη ERα. Επίσης, η απουσία μη ειδικού σήματος αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα MDA-MB-231 κύτταρα δεν εμφανίζονται θετικά ως προς την ύπαρξη ERα, γεγονός που επαληθεύεται, όπως προαναφέρθηκε από δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Al-Bader et al, 2011).

5.1.2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERβ) ΣΕ ΚΑΙ N2A SHSY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ

Για τη μελέτη της πιθανής διαφορικής εντόπισης των δύο μορφών του υποδοχέα οιστρογόνων στις κυτταρικές σειρές N2A και SH-SY5Y εκτελέστηκαν όμοιες δοκιμασίες με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ.



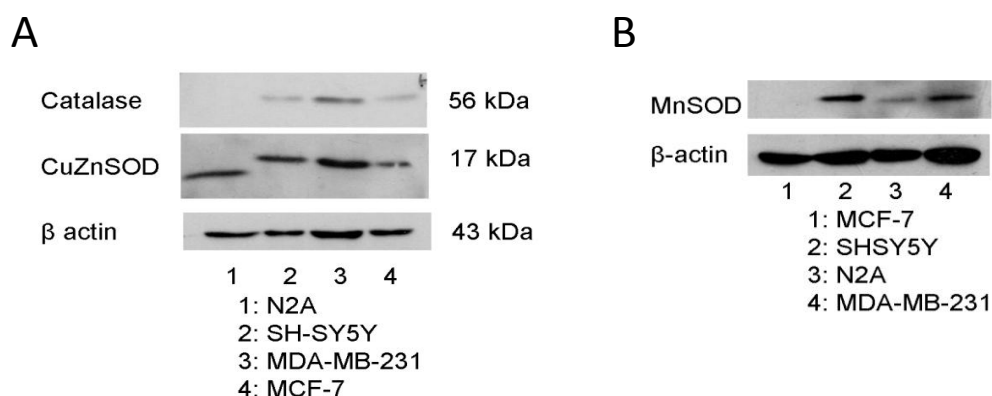


Σχήμα 2. Διερεύνηση της κυτταρικής εντόπισης του ERβ σε N2A και SH-SY5Y κύτταρα. Α. Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2A, SH-SY5Y, MCF-7 (θετικά ως προς την παρουσία ERα και αρνητικά ως προς την παρουσία ERβ) MDA-MB-231 (ανιχνεύσιμα επίπεδα ERβ) ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ERβ και ακτίνης (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) με χρήση ειδικών αντισωμάτων (ERβ-H-150, Santa Cruz; Actin, Sigma). Β. Ανοσοκυταροχημική διερεύνηση της εντόπισης ERβ σε SH-SY5Y κύτταρα. Μονιμοποίηση των κυττάρων με MeOH/Aceton, CMXROS: μιτοχονδριακή χρώση, Hoechst: πυρηνική χρώση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western τα κύτταρα SH-SY5Y (διαδρομή 2) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης ERβ. Μικρότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στη διαδρομή 1 (N2A wt κύτταρα), τα οποία όμως είναι σημαντικά μεγαλύτερα από αυτά των MDA-MB-231 κυττάρων (διαδρομή 3) λαμβάνοντας υπόψιν και τα επίπεδα της ακτίνης τα οποία συνεκτιμούνται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως αναμενόταν, σύμφωνα με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας τα MCF-7 κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλά μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ERβ. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κατά Western επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας και αποδεικνύουν την παρουσία σχετικά υψηλών επιπέδων ERβ και στις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

Στην εικόνα Β απεικονίζονται: Α) Πυρήνες των κυττάρων, χρώση με Hoechst Β) ERβ Γ) μιτοχόνδρια, χρώση με CMX ROS Δ) εικόνες Β&Γ, το πορτοκαλί χρώμα δείχνει την συνεντόπιση του μιτοχονδριακού δείκτη, CMX με τον ERβ ταύτιση των σημείων των δύο εικόνων και άρα την πιθανή ύπαρξη ERβ στα μιτοχόνδρια.

5.1.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ N2A ΚΑΙ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



Σχήμα 3. Διερεύνηση ανίχνευσης αντιοξειδωτικών ενζύμων σε N2A, SH-SY5Y, MDA-MB-231 και MCF-7 κύτταρα με χρήση ειδικών αντισωμάτων. Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2A, SH-SY5Y, MCF-7 και MDA-MB-231 ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία καταλάσης, μιτοχονδριακής μαγγανικής δισμουτάσης σουπεροξειδίου (MnSOD) και κυτταροπλασματικής δισμουτάσης σουπεροξειδίου (CuZnSOD). A. Διαδρομές: 1. N2A wt, 2. SH-SY5Y 3 MDA/MB 231, 4. MCF 7 B. Διαδρομή 1. MCF 7 κύτταρα, 2. SH-SY5Y (θετικό αποτέλεσμα), 3. N2A wt, 4. MDA/MB 231 (marker γνωστών μοριακών βαρών).

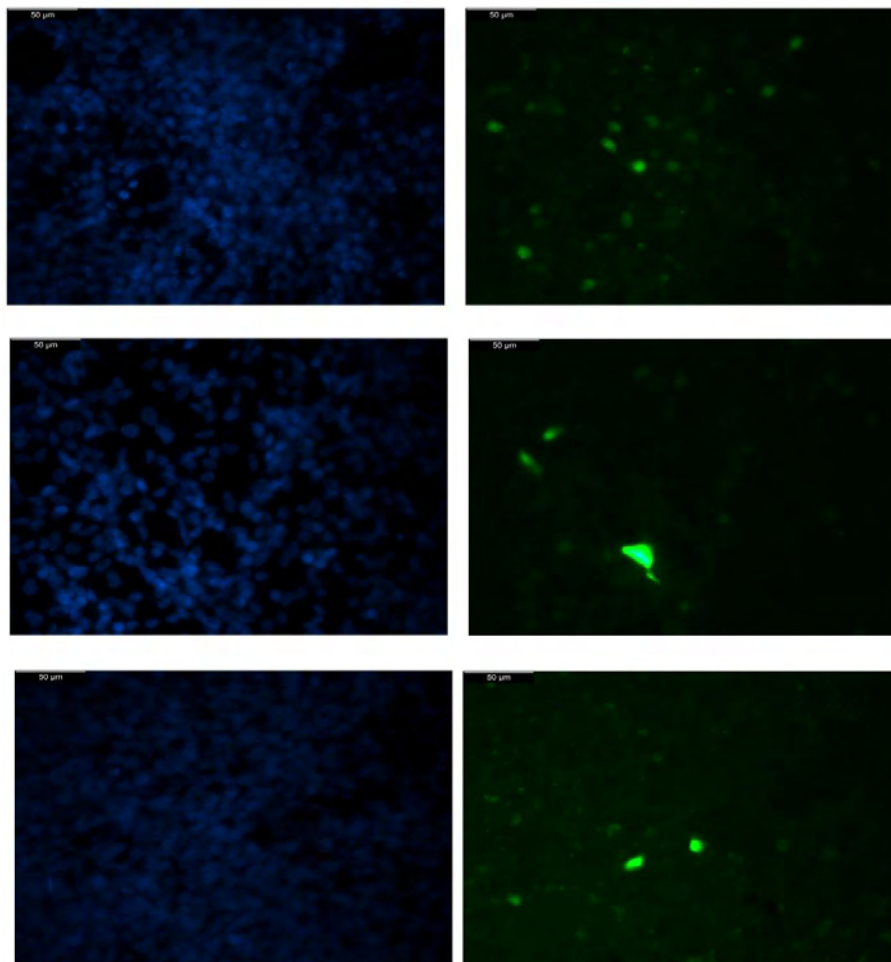
Παρατηρούμε ότι οι τρεις κυτταρικές (N2A wt, SH-SY5Y, MDA-MB 231) οι οποίες σύμφωνα με τις πειραματικές δοκιμασίες 5.1.1, και 5.1.2 είναι θετικές όσο αφορά την έκφραση του ERβ εμφανίζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων, με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης αυτών συγκριτικά με τα MCF-7 κύτταρα.

5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ WT N2A ΚΑΙ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Εφόσον, μέσω των ανοσοχημικών τεχνικών επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός των wt N2A και SH-SY5Y νευρικών κυτταρικών σειρών όσο αφορά την ύπαρξη των υποδοχέων οιστρογόνων, το επόμενο βήμα είναι η διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης του ACH στις δύο κυτταρικές σειρές. Δεδομένου ότι η εκτίμηση του οιστρογονικής δράσης του ACH μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση της δραστηριότητας των ενδογενών υποδοχέων, με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης της γονιδίου αναφοράς υπό την επίδραση οιστρογονοεξαρτώμενων αλληλουχιών DNA, πραγματοποιήθηκε έλεγχος βέλτιστων συνθηκών παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων και μέτρηση της δραστηριότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης σε κατάλληλα διαμολυσμένα κύτταρα.

Η πιστοποίηση των βέλτιστων συνθηκών παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας ως πλασμιδιακό DNA πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε πλαίσιο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί

την έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών παρατίθενται στην εικόνα που ακολουθεί.



Σχήμα 4: Χαρακτηρισμός βέλτιστων συνθηκών διαμόλυνσης SH-SY5Y κυττάρων. Ανοσοϊστοχημική μελέτη, για την εύρεση των βέλτιστων χειρισμών, με σκοπό το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, στην παροδική διαμόλυνση-transfection, των νευρικών κυτταρικών σειρών. Η διαμόλυνση έγινε με πλασμιδιακό φορέα pEGFPC2 GR σε κύτταρα SH-SY5Y A) Lipofectamine 2000 σε αναλογία DNA/ Lipofectamine: 1/2 B) CaCl₂ (CaCl₂/DNA: 5) Γ) CaCl₂ (CaCl₂/DNA: 10).

Παρατηρούμε ότι η μέθοδος διαμόλυνσης με λιποφεκταμίνη παρά τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στα διαμολυσμένα κύτταρα είναι πιο αποτελεσματική συγκρινόμενη με αυτήν των αλάτων ασβεστίου όσο αφορά την αποτελεσματικότητα σε ποσοστό επιτυχώς διαμολυσμένων κυττάρων. Όμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε σε wt N2A κύτταρα χρησιμοποιώντας ως μέσο διαμόλυνσης A) CaCl₂ 5X, B) Fugene (Fugene/ DNA: ½, ¼) ή 2X και 4X Γ) Lipofectamine 2000 σε αναλογία DNA/ Lipofectamine.

Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών έδειξαν ότι η χρήση του Fugene είναι καλύτερη από τις δύο άλλες, αλλά, λόγω τεχνικών δυσκολιών δεν υπάρχει διαθέσιμη συγκριτική εικόνα.

5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΛΑΤΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εφόσον, περατώθηκαν οι πειραματικές προσεγγίσεις που αφορούσαν τη διερευνήση των συνθηκών παροδικής διαμόλυνσης, ξεκίνησε το επόμενο στάδιο της εργασίας, που σχετίζεται με τη μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης ενώσεων αργιλίου καθώς επίσης και της πιθανής επίδρασης τους σε αντιοξειδωτικούς– αντιπροσπρωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου συσχετιζόμενους με οιστρογονική δράση.

Για τη μελέτη αυτή, έγινε τόσο ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όσο και ανοκυτταροχημική μέθοδος παρατήρησης της δράσης των μορίων αυτών.

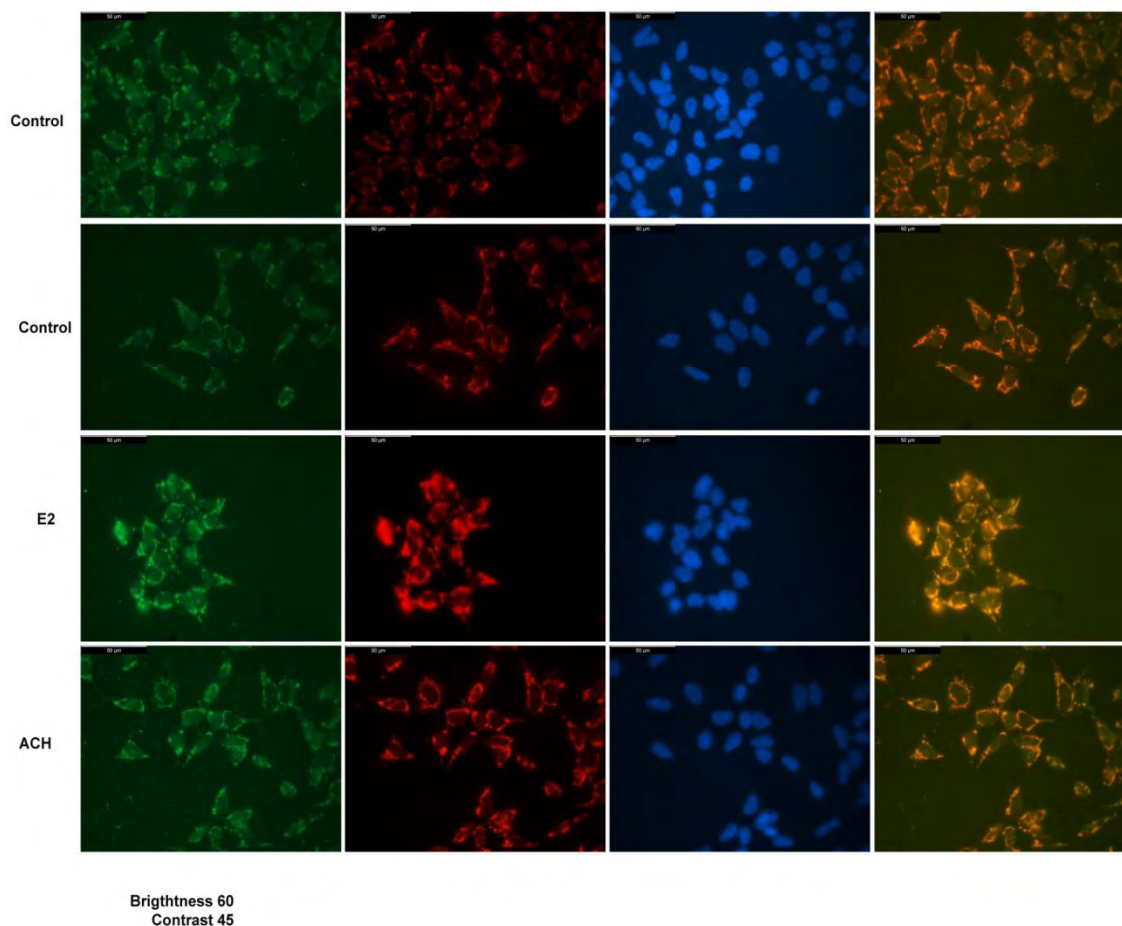
5.3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΗΣ E2 ΚΑΙ ACH ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ N2A wt.

Η δοκιμασία αυτή έλαβε χώρα μετά την παροδική διαμόλυνση κυττάρων wt N2A με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, χρησιμοποιώντας πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση γονιδίων β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφεράσης. Πειραματικά, πραγματοποιήθηκε όπως εξηγήθηκε σε σχετική παράγραφο παραπάνω. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 10^{-9} M E2 και 10^{-4} M ACH για χρονικό διάστημα 4 ωρών. Στην συνέχεια ακολούθησε έκπλυση, λύση των κυττάρων και προσδιορισμών δραστηριοτήτων λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφονται στην σχετική παράγραφο.

Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της δραστηριότητας των ενδογενών ERs παρουσία ή όχι E2 τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας θεωρήθηκαν μη έγκυρα και μη αξιοποιήσιμα και ως εκ τούτου δεν θα παρατεθούν.

5.3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH σε νευρικά κύτταρα έγινε συγκριτική μελέτη της επίδρασης ACH και E2 στην υποκυτταρική κατανομή του ERβ, δεδομένου ότι αυτός ο τύπος του υποδοχέα φαίνεται να επικρατεί σε νευρικά κύτταρα και επομένως μέσω αυτού θα επιτελείται η πιθανή οιστρογονική δράση του ACH. Επίσης, δεδομένου ότι η υποκυτταρική κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων διαφοροποιείται μεταξύ ανερέθιστων και ενεργοποιημένων κυττάρων, η όλη δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα τα οποία 48 ώρες πριν την προσθήκη ACH και E2 αναπτύσσονταν σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό, στο οποίο προστίθεται ειδικά κατεργασμένο FBS (FBS cis, επεξεργασμένο με ενεργό άνθρακα υπό στείρες συνθήκες), με σκοπό την εξάλειψη ορμονών σε αυτό.

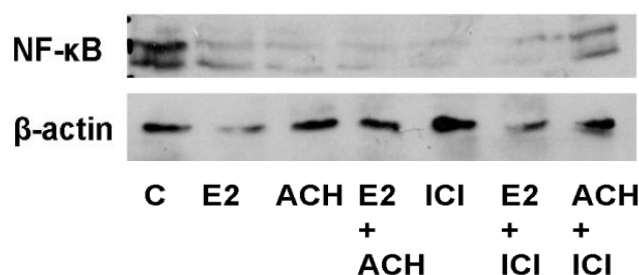
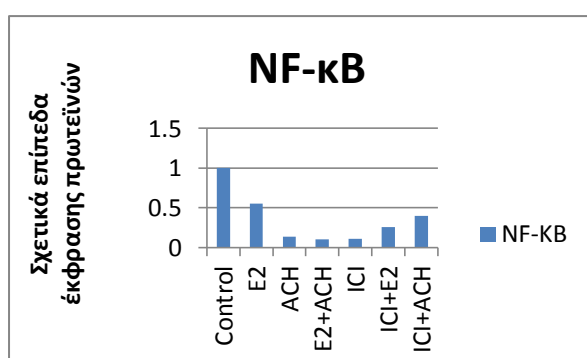
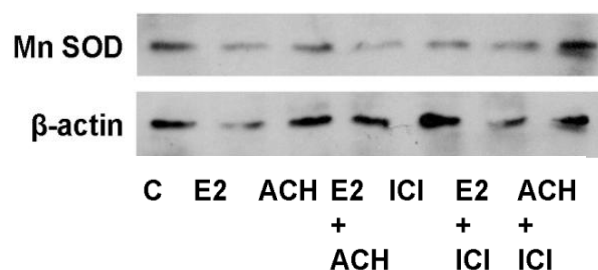
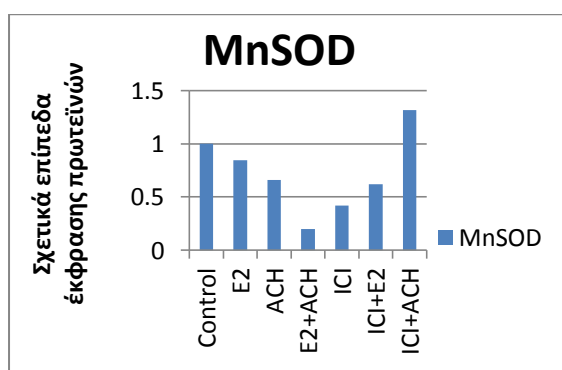
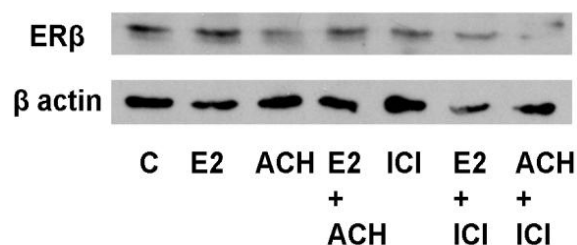
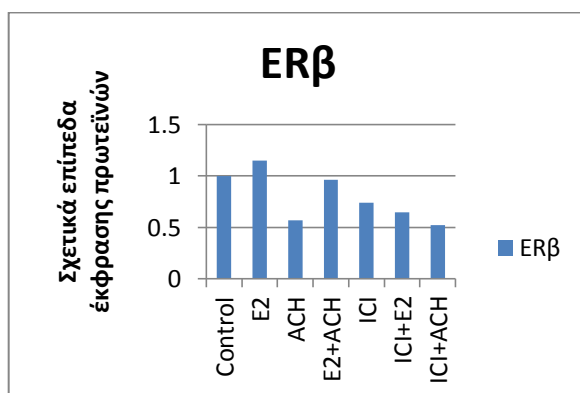


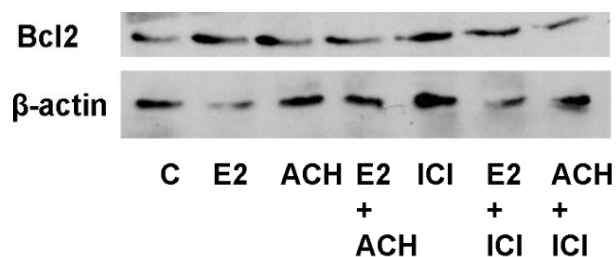
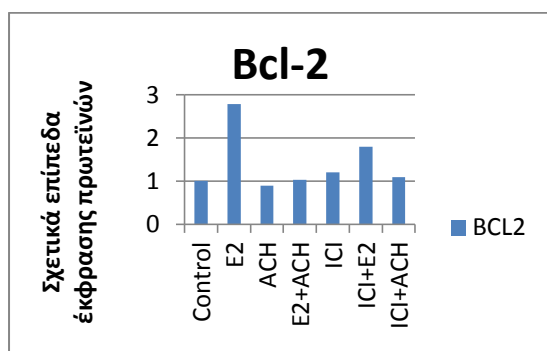
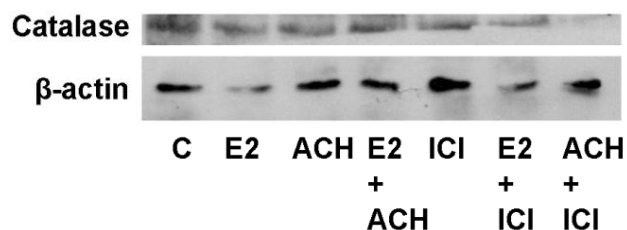
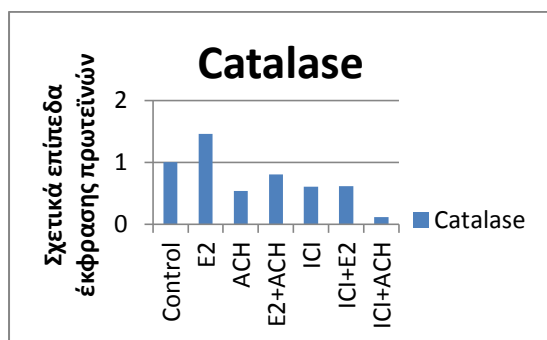
Σχήμα 5: Ανοσοκυτταροχημική μελέτη, της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα των οιστρογόνων ERβ, σε κύτταρα SH-SY5Y. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν με τις ουσίες E2 ($10^{-9}M$) και ACH ($10^{-4}M$) (όπως αναφέρεται παραπάνω και σε σχετική παράγραφο). Έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με MeOH/Aceton, CMXRos: μιτοχονδριακή χρώση, Hoechst: πυρηνική χρώση. Η 4^η εικόνα σε κάθε σειρά, αποτελεί άθροισμα της πρώτης και δεύτερης εικόνας. Παρατηρείται ενίσχυση του εντοπισμού του ERβ στα μιτοχόνδρια, κατά τη χορήγηση οιστραδιόλης, ενώ παρόμοια δράση φαίνεται να έχει και το αργίλιο.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα. Απουσία ορμονών, σε ανερέθιστα κύτταρα μάρτυρες, ο ERβ εντοπίζεται διάχυτος στο κυτταρόπλασμα, όπως και αναμενόταν, ενώ παρουσία τόσο E2 όσο και ACH εμφανίζει πιθανή μιτοχονδριακή εντόπιση, όπως υποδηλώνεται από τον κοινό μοτίβο εντοπισμού ERβ και του μιτοχονδριακού δείκτη CMXRos. Η όμοια με την E2 επίδραση του ACH στη υποκυτταρική εντόπιση του ERβ υποδηλώνει την πιθανή οιστρογονική του δράση.

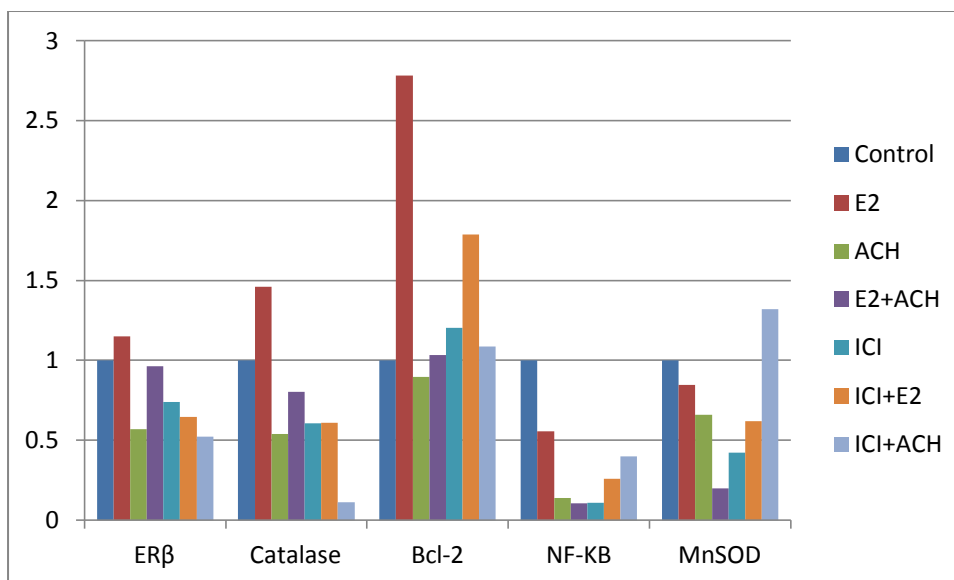
5.3.3 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΚΑΙ E2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ SH-SY5Y ΚΥΤΤΑΡΑ

Δεδομένου ότι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ERβ παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση σε διάφορους τύπους κυττάρων, μεταξύ αυτών και νευρικών, διερευνήθηκε κατά πόσο η σε διάφορες περιπτώσεις παρατηρούμενη επαγωγή από ACH νευροεκφυλιστικών νόσων σχετίζεται τόσο με τα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων όσο και με τα επίπεδα έκφρασης του ERβ.





Σχήμα 6: Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων: ERβ, MnSOD, NFκ-B, καταλάση και Bcl-2 σε νευρικά κύτταρα N2A. Β. Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2A, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί και επωαστεί με $10^{-9}M$ E2, $10^{-4}M$ ACH, $10^{-7}M$ ICI και συνδυασμού (βλ. §3.3.1) ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στην έκφραση των παραπάνω μορίων. Η μελέτη της εντόπισης και των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων ERβ-H150, β-actin (κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων), MnSOD (sc-G20), NFκ-B (sc-109), καταλάση (RnDSsystems) και Bcl2(SC). Α. Απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης.



Σχήμα 7: Συγκεντρωτικό σχήμα, παρουσίαση των αποτελεσμάτων του σχήματος 6.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και μέσω της δράσεως του, εμπλέκεται σε πάρα πολλά βιοχημικά μονοπάτια που είναι αναγκαία για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Εντοπίζεται σε δύο κύριες ισομορφές, την άλφα και τη βήτα, οι οποίες και φαίνεται, σε ορισμένες περιπτώσεις να έχουν μεταξύ τους αντίθετες δράσεις (Hodges-Gallagher et al. 2008). Ο ρόλος της οιστρογονικής σηματοδότησης έχει φανεί να είναι καίριος και κατά την παθογένεση ορισμένων μορφών καρκίνου αλλά και άλλων διαταραχών μεταξύ των οποίων και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Κατά τη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διπλωματικής εργασίας, έλαβαν χώρα μία σειρά πειραμάτων που είχαν ως σκοπό τη διερεύνηση της εν δυνάμει οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH), σε νευρικά κύτταρα (καρκινικές κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και wtN2A).

Ξεκινώντας τη μελέτη, στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιώντας τόσο ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, όσο και ανοσοαποτύπωση Western, έγινε σαφές, ότι οι εν λόγω κυτταρικές σειρές περιείχαν αποκλειστικά ή πολύ υψηλά επίπεδα της βήτα ισομορφής του υποδοχέα των οιστρογόνων (ERβ) σε σχέση με την άλφα μορφή. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αναλογιζόμενοι των δράσεων της βήτα ισομορφής. Από δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Picard et al. 2014, Manente et al. 2013, Chen et al. 2014), ο ERβ, αποτελεί την ισομορφή που εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, ρυθμίζοντας εκεί την έκφραση κάποιων γονιδίων που ανήκουν στο mtDNA. Επιπλέον, με ανοσοϊστοχημεία, ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε ο τοπικός εντοπισμός του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, η μιτοχονδριακή ισομορφή, διαδραματίζει στο ΚΝΣ σπουδαίο ρόλο στην πλαστικότητα των νευρώνων αλλά και στην προστασία από οξειδωτικό στρες. Έχοντας λοιπόν, την πληροφορία της ύπαρξης του ERβ στα υπό μελέτη νευρικά κύτταρα,

μπορέσαμε να προχωρήσουμε ένα βήμα παρακάτω, προκειμένου να μελετηθεί η δρασικότητά του.

Η διερεύνηση της δρασικότητας έγινε με την εκτέλεση των πειραμάτων της παροδικής διαμόλυνσης και τη μέτρηση δρασικότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης. Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα παραπάνω, τα κύτταρα δεν φάνηκαν να είναι δεκτικά στην συγκεκριμένη διαδικασία. Παρόλα αυτά, πιστοποιήθηκε ότι το καλύτερο αποτέλεσμα φέρει η διαμόλυνση με το fucose. Τόσο η πληροφορία αυτή, όσο και το σύνολο των δεδομένων που αποκτήθηκαν κατά την πραγματοποίηση όλων των προσπαθειών επιτυχίας της διαδικασίας της παροδικής διαμόλυνσης, αποτελούν σπουδαίο απόκτημα γνώσης για μελλοντικό χειρισμό των κυτταρικών σειρών αυτών.

Κατόπιν, περνώντας στο κυρίως αντικείμενο της εργασίας, έγινε μελέτη της δράσης της οιστραδιόλης (E2) συγκριτικά με το ACH, παρουσία και απουσία του τεχνητού αναστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων ICI 182.780. Στο σύνολό τους, όλες οι διαδικασίες εξέτασης της οιστρογονικής δράσης έγιναν ύστερα από καλλιέργεια και επώαση των κυττάρων με τις ουσίες αυτές, για διάστημα τριών ημερών. Έπειτα, έλαβε χώρα τόσο ανοσοϊστοχημική, όσο και μελέτη μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, κατά τις οποίες ελήφθησαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Η ανοσοκυτταροχημεία έδειξε πως τόσο η οιστραδιόλη (E2) όσο και το ACH διεγείρουν την μετατόπιση του ERβ στα μιτοχόνδρια, παρουσιάζοντας παρόμοια εικόνα. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε συμφωνία, τόσο με τη διεθνή βιβλιογραφία για διέγερση της οιστρογονικής σηματοδότησης από το ACH (ως μεταλλοοιστρογόνο) (Darbre, 2005), όσο και με τη δική μας αρχική υπόθεση. Παράλληλα, όμως το αποτέλεσμα αυτό δεν δίνει κάποια περαιτέρω πληροφορία για τη μετέπειτα δράση του υποδοχέα στις δύο περιπτώσεις ή για την ποσότητα του υποδοχέα που διεγείρεται (πέρα από το οπτικό αποτέλεσμα που ελαφρώς διαφέρει), ή για τα μονοπάτια που συνεχίζεται η σηματοδότηση και τα γονίδια που επηρεάζονται. Απάντηση σε κάποια από αυτά τα ερωτήματα τείνουν να δώσουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν στη συνέχεια από μελέτες εφαρμόζοντας τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης Western.

Με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western εξετάστηκε η επίδραση E2, ACH και ICI στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των εξής μορίων: ERβ, MnSOD, NFκ-B, καταλάση, Bcl2 και β-ακτίνη (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) σε νευρικά κύτταρα N2A wt. Για την καλύτερη και εγκυρότερη επεξήγηση των αποτελεσμάτων, έγινε και σχετική ποσοτικοποίηση των μπαντών από τις εμφανίσεις με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος ποσοτικοποίησης. Αυτό που ως κύριο συμπέρασμα βγαίνει από τα περισσότερα διαγράμματα (βλ. αποτελέσματα), είναι πως το ACH έχει μάλλον ανταγωνιστική παρά συναγωνιστική δράση με την οιστραδιόλη. Παρατηρούμε πως, σε σχέση με την οιστραδιόλη η διέγερση που προκαλεί το ACH είναι κατά πολύ μικρότερη, ενώ παράλληλα η συν-παρουσία των δύο ενώσεων προκαλεί μειωμένη απόκριση σε σχέση με την E2. Η παρατήρηση αυτή, ενισχύει το γεγονός της ανταγωνιστικής δράσης, διότι αν η δράση ήταν συναγωνιστική, η παράλληλη παρουσία και των δύο ουσιών ενδεχομένως θα εκτόξευε τη δράση πάνω και από την E2.

Τα δεδομένα που λαμβάνουμε από την επώαση με το ICI δεν είναι 100% αξιόπιστα, εφόσον η διάλυση του, λόγω πειραματικού σφάλματος, έγινε σε ddH₂O και όχι σε DMSO, που είναι ο διαλύτης της ουσίας και γι' αυτό το λόγο δεν είμαστε σίγουροι για τη αποτελεσματική διαλυτοποίησή του και κατά συνέπεια τη ακριβή συγκέντρωσή του. Επιπλέον, η μη αποτελεσματική αντιστροφή των δράσεων του ACH παρουσία ICI πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση του ICI σε σχέση με το ACH. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, αποτελεσματικές συγκεντρώσεις ανταγωνιστή είναι αυτές των X10 ή X100. Κάτι το οποίο είναι απαγορευτικό για την περίπτωση του ICI δεδομένου ότι αυτό διαλύεται αποτελεσματικά σε DMSO, του οποίου η μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση για τα κύτταρα είναι 0,2%. Παρόλα αυτά, σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρούμε ανταγωνιστική δράση του ICI έναντι της E2 όπως και αναμενόταν. Παρουσία ICI και ACH στις περισσότερες περιπτώσεις, εκτός της μελέτης της MnSOD, πιθανόν λόγω πειραματικού σφάλματος, παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών, η οποία είναι σε συμφωνία με την ανταγωνιστική δράση των δύο μορίων ICI και ACH σε σχέση με τα ενδογενή, έστω και χαμηλά επίπεδα E2.

Τα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων, των οποίων η έκφραση επάγεται από τον ERβ, σύμφωνα με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας όπως π.χ. της μαγγανικής δισμουτάσης υπεροξειδίου (MnSOD) (Pedram et al. 2006) πιθανόν να οφείλονται και στην αρνητική επίδραση του ACH στα επίπεδα έκφρασης του ίδιου του ERβ. Μένει να διερευνηθεί ο ακριβής μηχανισμός αυτής της επίδρασης, το κατά πόσο δηλαδή οι ενώσεις αργιλίου επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου ERβ, τη σταθερότητα του παραγόμενου mRNA ή και της ίδιας της εκφρασμένης πρωτεΐνης.

Αναλογιζόμενοι τα αποτελέσματα που αποκτήσαμε και εισάγοντάς τα στην παθογένεση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, θα μπορούσαμε με κάθε επιφύλαξη, να συμπεράνουμε πως, το αργίλιο, μιμείται τα φυσικά οιστρογόνα ως προς την ενεργοποίηση της υποκυτταρικής μετακίνησης του υποδοχέα, ενεργοποιώντας τη μιτοχονδριακή μετατόπιση του υποδοχέα. Μένει να μελετηθεί, κατά πόσο το ACH και γενικότερα τα άλατα αργιλίου ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων του ERβ. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση υπό τον έλεγχο οιστρογονοεξαρτώμενων υποκινητών (πχ. κατασκευή ERE-Luc).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, διαφαίνεται επίσης ότι τα άλατα αργιλίου επηρεάζουν αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης του ERβ, και κατά συνέπεια περιορίζουν τις επιθυμητές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές δράσεις του ERβ και μάλιστα της μιτοχονδριακής του μορφής στα νευρικά κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή, ρίχνει φως στην κατανόηση των μηχανισμών επαγωγής νευροεκφυλιστικών νόσων από τις ενώσεις αργιλίου. Η μείωση των επιπέδων ERβ, ενδεχομένως και της δραστικότητάς του, παρουσία αργιλίου σε νευρικά κύτταρα πιθανόν να σχετίζεται με την επαγωγή και πρόοδο κάποιων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Έτσι παρατηρώντας τα επίπεδα έκφρασης μορίων όπως η καταλάση και τη μαγγανική υπεροξειδάση, βλέποντας παράλληλα τη μειωμένη τους έκφραση με τη χορήγηση ACH, συμπεραίνουμε μία πτώση στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν μία όμοια ανταγωνιστική δράση του ACH στη από E2 επαγόμενη έκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων όπως η Bcl-2. Συνολικά η πτώση αυτή, θα μπορούσε να έχει σε βάθος χρόνου, μία συνεχόμενη και τοπική αύξηση του

οξειδωτικού στρες, η οποία και σε σχέση με την χρόνια ήπια φλεγμονή, που συνεπάγεται της ύπαρξης οξειδωτικού στρες, θα μπορούσε, μαζί με άλλους παράγοντες, όπως η μειωμένη αντι-αποπτωτική άμυνα να οδηγήσει σε προοδευτικό νευροεκφυλισμό.

Τέλος, όλα αυτά τα δεδομένα, είναι αποτέλεσμα της εφ' άπαξ εφαρμογής σχετικά μικρής συγκέντρωσης (10^{-4} M) ACH, τριήμερης επώασης και άμεσης συλλογής των κυττάρων. Από τη μεριά της διεθνούς ιατρικής κοινότητας έχει σημειωθεί συναγερμός για την σε βάθος χρόνο συσσώρευση του αργιλίου σε ιστούς όπως οι πνεύμονες και το ΚΝΣ, γεγονός που συμβάλλει στην χρόνο με το χρόνο αυξανόμενη τοξικότητά του. Για το λόγο αυτό οι προσδιοριζόμενες στο αίμα συγκεντρώσεις είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με τις υπάρχουσες συγκεντρώσεις του αργιλίου στους διάφορους ιστούς, ατόμων που συστηματικά εκτίθενται. Έτσι, μάλιστα μία μεγάλη και ανοιχτή έρευνα για την επίπτωση που μπορεί να έχει στην υγεία σε βάθος χρόνου, η καθημερινή έκθεση ενός ατόμου σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις αργιλίου, λ.χ με την καθημερινή εφαρμογή αποσμητικού.

Σε δεύτερο χρόνο, λοιπόν, απαιτείται η περαιτέρω μελέτη τόσο των μορίων που συμμετέχουν, όσο και των μηχανισμών που εμπλέκονται και των διακυτταρικών μονοπατιών που διαταράσσονται, προκειμένου ένα κύτταρο να χάσει την φυσιολογική του πορεία και να μπει σε μονοπάτια παθογένεσης, ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού ή εκφυλισμού.

Βιβλιογραφία

1. AG Manente, D. Valenti², G. Pinton, PV. Jithesh, A. Daga, L. Rossi, SG. Gray, KJ O'Byrne, DA. Fennell, RA. Vacca, S. Nilsson, L. Mutti and L. Moro, (2013) , Estrogen receptor b activation impairs mitochondrial oxidative metabolism and affects malignant mesothelioma cell growth in vitro and in vivo, *Oncogenesis*,e72; doi:10.1038/oncsis
2. A. Vaziri and A. Mohammadi,(2010), Epigenetic Effects of Carcinogens, *Journal of Biological Sciences*, 10 (3):200-208
3. A. Pedram, M. Razandi, D.C. Wallace, and E. R. Levin, (2006), Functional Estrogen Receptors in the Mitochondria of Breast Cancer Cells, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 17, 2125–2137
4. A. Razmara, L. Sunday, C. Stirone, X. Bo Wang, D.N. Krause, S.P. Duckles, and V. Procaccio, (2008), Mitochondrial Effects of Estrogen Are Mediated by Estrogen Receptor α in Brain Endothelial Cells, *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, Vol. 325, No. 3, 134072/3343405
5. A. Grimm,Y. Lim, A. Guy Mensah-Nyagan, J. Götz, A.Eckert, (2012), Alzheimer's Disease, Oestrogen and Mitochondria: an Ambiguous Relationship, *Mol Neurobiol* 46:151–160

6. A-P. Sappino, R. Buser, L. Lesne, S. Gimelli, F.Béna, D. Belin and S. J. Mandriota, (2012), Aluminium chloride promotes anchorageindependent growth in human mammary epithelial cells, *J. Appl. Toxicol.* 32: 233–243
7. B.J. Deroo and K.S. Korach, (2006), Estrogen receptors and human disease, *J. Clin. Invest.* 116:561–570
8. B.J. Deroo and A.V. Buensuceso (2010), Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology* 24: 1703–1714
9. C.S. Watson, Y-J. Jeng, J. Guptarak, (2011), Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127 , 44– 50
10. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD., 2004, Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Jun;286(6):E1011-22.
11. Christoforou P., Christopoulos PF, Koutsilieris M. (2014), The role of Estrogen Receptor Beta in Prostate Cancer, *Molecular Medicine*
12. I. J. McEwan and A. M. Nardulli, (2009), Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors NRS , Vol. 7
13. J. G. Crawford (1998), Alzheimer's disease risk factors as related to cerebral blood flow: additional evidence, *Medical Hypotheses* 50, 25-36
14. J.L. Fitzpatrick, A.L. Mize, C. B. Wade, J. A. Harris, R. A. Shapiro and D.M. Dorsa, (2002), Estrogen-mediated neuroprotection against b-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor a or b and activation of the MAPK pathway, *Journal of Neurochemistry*, 82, 674–682
15. J. Cui, Y. Shen, and R. Li, (2013), Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain, *Trends Mol Med.* 19(3): 197–209.
16. J. M. Hall, J. F. Couse, K. S. Korach , (2001), The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 40, pp. 36869–36872

17. L. Hodges-Gallagher, Z Cathleen, D Valentine, Z. Suzy, El Bader, Z Peter J. Kushner, (2008), Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat* 109:241–250
18. L. Bjornstrom and M. Sjoberg,(2005), Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes *Mol Endocrinol*, 19(4):833–842
19. L. Pietranera, M. Elvira Brocca, P. Roig, A. Lima, L. Miguel Garcia-Segura, A.F. De Nicola, (2014), Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
20. L. Pietranera, M. Brocca, P Roig, A. Lima, L. M. Garcia-Segurac, A. F. De Nicola, (2014), Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
21. M. Al-Bader, C. Ford, B. Al-Ayadhy and I. Francis, (2011), Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines, *Experimental and Therapeutic Medicine*2: 537-544
22. M. Picard and B. S. McEwen, (2014), Mitochondria impact brain function and cognition, *PNAS* , vol. 111 no. 1,7–8
23. M. M. Steward, A.Sridhar and J. S. Meyer, (2013) *New Perspectives in Regeneration*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Nibedita Gupta and Doris Mayer, (2013), Interaction of JAK with steroid receptor function, *JAK-STAT* 2:4, e24911.© Landes Bioscience
24. Miller J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
25. N. Heldring, A.Pike, S. Andersson, J. Mathwes, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujaque, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, J-A K.Gustafsson, (2007),Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, *Physiol Rev* 87: 905–931, doi:10.1152/physrev.00026.2006.
26. N.A-Gonzalez and A. Hidalgo, (2014), Nuclear receptors and clearance of apoptotic cells: stimulating the macrophage's appetite, *Frontiers in immunology*, Volume 5, Article 211

27. N. Suwanna, W.Thangnipon, R. Soi-ampornkul (2014), Neuroprotective effects of diarylpropionitrile against β -amyloidpeptide-induced neurotoxicity in rat cultured cortical neurons, *Neuroscience Letters* 578 ,44–49
28. P. J. Kushner, D. A. Agard , Geoffrey L. Greene , Thomas S. Scanlan, A. K. Shiau, R.M. Uht, P.Webb, (2000), Estrogen receptor pathways to AP-1, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74 ,311–317
29. Paternil, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F (2014), Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, S0039-128X(14)00151-2. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
30. P.D Darbre,(2005), Aluminium, antiperspirants and breast cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1912–1919
31. P. D. Darbre, (2006), Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol*; 26: 191–197
32. P. Dey, R. P A Barros, M.Warner, A. Strom and J-Å Gustafsson, (2013), Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor b in the breast, prostate, colon and CNS, *Journal of Molecular Endocrinology* 51, T61–T74
33. R. Viñas, Y-J Jeng and C.S. Watson, (2012), Non-Genomic Effects of Xenoestrogen Mixtures, *Int. J. Environ. Res. Public Health*
34. S. Vucetic-Arsic , N.V.Radonjic, M. Jovanovic, V. Selakovic, T. Nikolic, M. Velimirovic, T. Stojkovic, A. Milovanovic, J. Milovanovi, N.D.Petronijevic, (2013), Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36 1242-1252
35. S.C. Bondy, (2014), Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration, *Toxicology* 315 ,1– 7
36. Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. ,2005, Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm:localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece, *Hum Reprod.* Dec;20(12):3481-7. Epub Aug 25.
37. Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE.,2005,Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the

mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 celllines. Biochim Biophys Acta. Sep 30;1745(3):382-92.

38. X. Liu, X-Lan Fan, Y. Zhao, G-R Luo, X-P. Li, R. Li and W.-D Le, (2005), Estrogen Provides Neuroprotection Against Activated Microglia-Induced Dopaminergic Neuronal Injury Through Both Estrogen Receptor-a and Estrogen Receptor-b in Microglia, Journal of Neuroscience Research 81:653–665

39. Σημειώσεις και εκπαιδευτικό υλικό του μαθήματος του Έ εξαμήνου, «Νευροεπιστήμες και Συμπεριφορά», Δρ. Α. Ζίφα, 2012

.